

# **Bedeutung von MIA (Melanoma- Inhibitory-Activity) bei der Entstehung und Progression des malignen Melanoms**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der Naturwissenschaftlichen Fakultät III - Biologie und Vorklinische Medizin - der

Universität Regensburg



vorgelegt von

**Jutta Tatzel aus Sindelfingen**

April 2005

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 6. April, 2005

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. AK Boßerhoff

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. Witzgall (Prüfungsvorsitzender)

Prof. Dr. Kurtz

Prof. Dr. Boßerhoff

Prof. Dr. Schneuwly

---

**Für meine Eltern**

**(Dr. Otto Tatzel, † 28. Oktober 2004)**

---

---

<b>1</b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>DIE MELANOZYTENENTWICKLUNG</b>	<b>3</b>
2.1.1	SIGNALWEGE IN DER MELANOZYTENENTWICKLUNG	5
2.1.1.1	Wnt/ $\beta$ -catenin-Signalweg	5
2.1.1.2	Alpha MSH und der cAMP-Signalweg	5
2.1.1.3	cKit- und der MAP-Kinase-Signalweg	6
2.1.2	TRANSKRIPTIONSFAKTOREN IN DER MELANOZYTENENTWICKLUNG	6
2.1.2.1	Der Transkriptionsfaktor MITF: Aufbau, Funktion, Expression	6
2.1.2.2	PAX3, Sox10 und Brn-2 in der Melanozytenentwicklung	9
2.1.3	MELANOGENESE	10
2.1.3.1	Enzyme der Melanogenese	11
2.1.3.2	Auslösende Faktoren für die Initiierung der Pigmentierung	11
<b>2.2</b>	<b>DAS MALIGN E MELANOM</b>	<b>12</b>
2.2.1	MELANOMENTSTEHUNG	13
2.2.2	DAS PROTEIN MIA (MELANOMA INHIBITORY ACTIVITY)	18
<b>2.3</b>	<b>ZIEL DER ARBEIT</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b><u>MATERIAL UND METHODEN</u></b>	<b>21</b>
<b>3.1</b>	<b>MATERIALIEN</b>	<b>21</b>
3.1.1	ALLGEMEINE MATERIALIEN	21
3.1.2	GERÄTE	22
3.1.3	ORGANISMEN	24
3.1.4	SÄUGERZELLINIEN	24
3.1.5	ANTIKÖRPER	24
3.1.6	OLIGONUKLEOTIDE	25
<b>3.2</b>	<b>MEDIEN, ANTIBIOTIKA UND PUFFER</b>	<b>26</b>
3.2.1	MEDIEN ZUR ANZUCHT VON E.COLI UND SÄUGERZELLKULTUREN	26
3.2.2	ANTIBIOTIKA	26
3.2.3	PUFFER UND LÖSUNGEN	26
<b>3.3</b>	<b>METHODEN</b>	<b>29</b>
3.3.1	ARBEITEN MIT ESCHERICHIA COLI	29

---

---

3.3.1.1 Kultivierung von Bakterien	29
3.3.1.2 Transformation von E.coli	29
3.3.1.3 Herstellung kompetenter Bakterien	29
3.3.1.4 Isolierung von Plasmid DNA	30
3.3.1.5 Isolierung von Plasmid DNA im größeren Maßstab (Midipräparation)	31
3.3.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	31
3.3.2.1 DNA Techniken	31
3.3.2.2 RNA-Techniken: RNA Isolierung aus Säugerzellen	33
3.3.2.3 Proteinchemische Methoden	33
3.3.3 ZELLKULTURMETHODEN	34
3.3.3.1 Kultivierung von eukaryontischen Zellen	34
3.3.3.2 Herstellung von Sphäroiden	35
3.3.3.3 Transfektion von Zellkulturzellen	35
3.3.3.4 Luciferase-Reportergen-Assay	35
3.3.4 TRANSMISSIONSLEKTRONENMIKROSKOPIE	36
3.3.5 LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN	36
<b>4 ERGEBNISSE</b>	<b>37</b>
<b>4.1 VORARBEITEN</b>	<b>37</b>
4.1.1 ZELLMODELL-BESCHREIBUNG	37
4.1.2 ARRAY UND POWERBLOT	38
4.1.3 ERGEBNISSE AUS ARRAY UND POWERBLOT	38
<b>4.2 DER EINFLUSS VON MIA AUF DIE ADHÄSIONSMOLEKÜLE N- UND E-CADHERIN</b>	<b>39</b>
<b>4.3 DAS TUMOR-ASSOZIIERTE INTEGRIN BETA3 (ITGB3) WIRD IN MIA-DEFIZIENTEN ZELLEN NICHT MEHR EXPRIMIERT</b>	<b>41</b>
<b>4.4 MIA-DEFIZIENTE ZELLEN ZEIGEN EINE MELANOZYTEN-ÄHNLICHE MORPHOLOGIE.</b>	<b>42</b>
<b>4.5 DIE PIGMENTIERUNGSKASKADE IN MIA-DEFIZIENTEN ZELLEN</b>	<b>45</b>
4.5.1 MECHANISMUS DER PIGMENTIERUNG	45
4.5.2 DIE REGULATION DER PIGMENTIERUNG IN MIA-DEFIZIENTEN ZELLEN	48
4.5.2.1 Die Expression von MITF:	49
4.5.2.2 Die Regulation von MITF in MIA-positiven Zellen	50
4.5.2.3 Die Regulation des Trp-1 Promotors in MIA-defizienten Zellen	53
4.5.2.4 PAX3 induziert die Transkription von trp-1	53
4.5.2.5 Die Regulation des Trp-1 Promotors durch Tbx-2	53

---

---

<b>4.6 BRN-2 WIRD AUF PROTEINEBENE NUR VON MIA-POSITIVEN ZELLEN</b>	
<b>EXPRIMIERT.</b>	<b>53</b>
<b>4.7 MIA ALS REGULATOR DER CHROMATINSTRUKTUR?</b>	<b>53</b>
<b>4.8 KURZE ÜBERSICHT DER ERGEBNISSE</b>	<b>53</b>
<b>5 DISKUSSION</b>	<b>53</b>
<hr/>	
<b>5.1 DIE FEHLENDE EXPRESSION TUMOR-RELEVANTER GENE IN MIA-DEFIZIENTEN</b>	
<b>ZELLEN</b>	<b>53</b>
5.1.1 MELANOMZELLEN DURCHLAUFEN EINE EPITHELIALE-MESENSCHYMALE TRANSITION	
(EMT).	53
5.1.2 MIA-DEFIZIENTE ZELLEN EXPRIMIEREN KEIN INTEGRIN BETA3 (ITGB3).	53
<b>5.2 MIA-DEFIZIENTE ZELLEN ÄHNELN IN IHRER MORPHOLOGIE MELANOZYTEN.</b>	<b>53</b>
<b>5.3 MIA-DEFIZIENTE ZELLEN SIND PIGMENTIERT.</b>	<b>53</b>
5.3.1 NUR MIA-DEFIZIENTE ZELLEN EXPRIMIEREN MITF, EINEN WICHTIGEN REGULATOR DER	
PIGMENTIERUNG.	53
5.3.1.1 Erk als Regulator der MITF-Stabilität	53
5.3.1.2 PIAS3 wirkt auf MITF destabilisierend.	53
5.3.2 PAX3 WIRD NUR VON MIA-DEFIZIENTEN ZELLEN EXPRIMIERT.	53
5.3.3 MIA INDUZIERT DIE EXPRESSION VON TBX-2.	53
<b>5.4 MIA REGULIERT DIE EXPRESSION DES POU-TRANSKRIPTIONSFAKTOR BRN-2.</b>	<b>53</b>
<b>5.5 MIA ALS REGULATOR DER CHROMATINSTRUKTUR?</b>	<b>53</b>
<b>5.6 FUNKTIONSWEISE VON MIA</b>	<b>53</b>
<b>5.7 FAZIT UND AUSBLICK</b>	<b>53</b>
<b>6 ANHANG</b>	<b>53</b>
<hr/>	
<b>6.1 ABKÜRZUNGEN</b>	<b>53</b>
<b>6.2 VERÖFFENTLICHUNGEN</b>	<b>53</b>
<b>6.3 LITERATURANGABEN</b>	<b>53</b>
<b>DANKSAGUNG</b>	<b>53</b>

# 1 Zusammenfassung

Der Hautkrebs ist eine der am weitesten verbreiteten Krebsformen. Seine Neigung zur Metastasierung ist für die Aggressivität des Tumors verantwortlich und führt schließlich zum Tod der betroffenen Patienten. Das Protein MIA (Melanoma Inhibitory Activity) wird nur von Melanomzellen, nicht jedoch von Melanozyten synthetisiert und sezerniert und ist mit dem Metastasierungsverhalten von Melanomzellen assoziiert.

In dieser Studie wurde die Rolle und Funktion von MIA auf die Entstehung von malignen Melanomen untersucht. Hierzu wurden Melanomzellen generiert, die aufgrund stabiler antisense-cDNA-Transfektion das Protein MIA nicht mehr exprimieren. Diese MIA-defizienten Melanomzellen wurden dann mit Hilfe von cDNA- und Antikörper-Arrays sowie mittels Powerblot-Analyse auf Unterschiede in der Gen- und Protein-Expression im Vergleich zu MIA-positiven Melanomzellen untersucht. Unterschiede in der Expression der zwei Zelllinien wurden anschließend durch PCR- beziehungsweise Western Blot-Analyse bestätigt. Vor allem Gene und Proteine, die direkt oder indirekt mit der Matrixdegradation (tPA, MT1-MMP), dem Übergang vom „radial growth phase“-Melanom zum „vertical growth-phase“-Melanom (Integrin beta3), oder der Proliferation assoziiert sind (Fibronectin) und für die Tumorentstehung und -progression eine wichtige Rolle spielen, wurden in MIA-positiven Zellen verstärkt exprimiert.

MIA-positive Melanomzellen unterschieden sich auch deutlich in der Morphologie von MIA-negativen Zellklonen. So waren MIA-positive Melanomzellen sehr groß, besaßen oft mehrere Nuklei und zeigten nicht die dendritischen Ausläufer wie MIA-defiziente Zellen. MIA-defiziente Zellklone waren im Gegensatz zu MIA-positiven Melanomzellen stark pigmentiert. All diese Unterschiede deuten darauf hin, dass der Verlust von MIA eine Rückbildung von Melanom-typischen morphologischen Charakteristika hin zur normalen Melanozytenmorphologie bewirkt. Auf molekularer Ebene wurde deutlich, dass MIA-positive Zellen keine pigmentierungs-relevanten Gene wie Tyrosinase und Trp-1 exprimieren und deren transkriptioneller Aktivator MITF auf Protein-Ebene reduziert vorlag. Untersuchungen zur Regulation des Transkriptionsfaktors MITF und der Pigmentierungs-relevanten Gene Trp-1 und Tyrosinase ergaben, dass MITF zum Teil über den MAP-Kinase-Weg reguliert wird, aber auch andere Faktoren auf die Stabilität von MITF Einfluss nehmen.

Neben MITF beeinflussen noch andere Faktoren die Induktion der Transkription von Trp-1 und Tyrosinase. Daher wurden weitere Kandidaten untersucht, welche die Transkription von Trp-1 und Tyrosinase in MIA-abhängiger Form regulieren könnten. Ein solcher Kandidat war

Tbx-2, ein transkriptioneller Repressor von Trp-1, der in MIA-positiven Melanomzellen exprimiert wurde, aber den Ergebnissen dieser Arbeit nach nicht allein für die Reprimierung der Trp-1-Transkription verantwortlich war. Selbst PAX3, ein transkriptioneller Aktivator des Trp-1 Promotors, der nur in MIA-defizienten Zellen exprimiert wird, induziert nicht die Trp-1 Transkription nach Transfektion in MIA-positive Melanomzellen. Weitere Kandidaten, wie der Transkriptionsfaktor Brn-2 aus der Familie der Pou-Domänen-Transkriptionsfaktoren, der in MIA-positiven Zellen exprimiert wird, werden derzeit noch auf eine mögliche Funktion in der Regulation der Pigmentierungs-relevanten Gene getestet.

Zusammenfassend kann postuliert werden, dass der spezifische Funktionsverlust von MIA zu einer morphologischen Rückbildung von melanom-typischen morphologischen Merkmalen führt, wobei der genaue molekulare Mechanismus dieses Effekts noch zu klären ist. Zum anderen zeigen MIA-defiziente Melanomzellen eine verminderte Expression von Genen und Proteinen, die an der Entstehung von malignen Melanomen beteiligt sind. Diese Ergebnisse untermauern die essentielle Rolle von MIA bei der Entstehung des malignen Melanoms. Die weitere Studie der molekularen Wirkungsweise von MIA könnte maßgeblich zum besseren Verständnis dieser Krankheit beitragen.

.



## 2 Einleitung

### 2.1 Die Melanozytenentwicklung

Neueren Beobachtungen zufolge wird die Melanomentstehung unter anderem als Fehlregulation von Transkriptionsfaktoren und Signalwegen betrachtet, die zu einem Großteil in der Melanozytenentwicklung eine wesentliche Rolle spielen (Goding, 2000; Herlyn et al., 2000). Melanozyten der Haut und der Haarfollikel, des Ohrs und der Aderhaut des Auges, aber auch Neuronal- und Gliazellen des peripheren Nervensystems, sowie Knochen- und Knorpelzellen des Kopfskeletts stammen von pluripotenten Zellen der Neuralleiste ab (Hou et al., 2000; Vance and Goding, 2004). Abbildung 1 zeigt schematisch die Migration der Neuralleistenzellen und ihre Bestimmung in den verschiedenen Geweben.

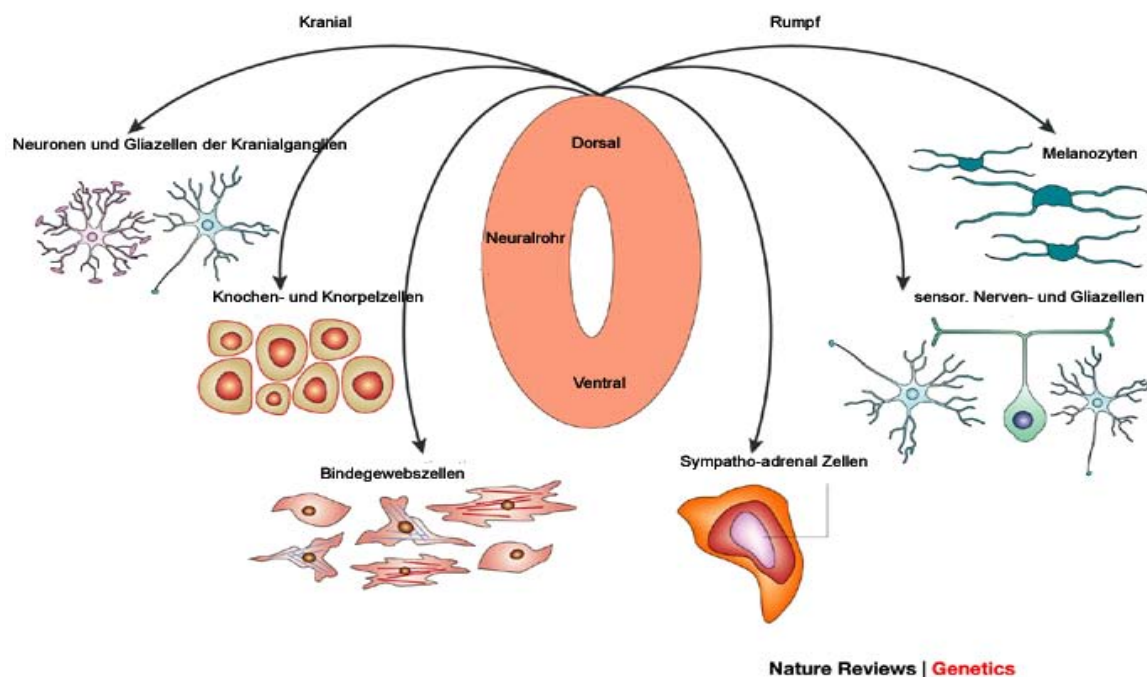


Abbildung 1: Entwicklung verschiedener Zelltypen wie Melanozyten, Knochen- und Knorpelzellen, Neuronen, und Bindegewebszellen aus der Neuralleiste (modifiziert nach (Knecht and Bronner-Fraser, 2002)).

Die Differenzierung der Neuralleistenzellen zu Melanozyten oder Neuronen beziehungsweise Gliazellen hängt sowohl vom Zeitpunkt der Zellwanderung als auch vom Migrationsweg ab.

Die Vorläufer der Melanozyten, die so genannten Melanoblasten, folgen einem Migrationsweg zwischen dem Oberflächenektoderm und dem Dermomyotom hindurch ins subektodermale Mesenchym (Dupin and Le Douarin, 2003).

Melanoblasten sind unpigmentiert und differenzieren im Menschen erst nach ihrer Wanderung in die Haut zu pigmentbildenden Melanozyten (Dupin and Le Douarin, 2003). Die menschlichen Melanozyten der Haut liegen in der Basalzellschicht und treten mit den Keratinozyten der Epidermis im Verhältnis 1:5 in Kontakt (Hsu et al., 2002). In Abbildung 2 ist der Aufbau der Haut schematisch dargestellt.

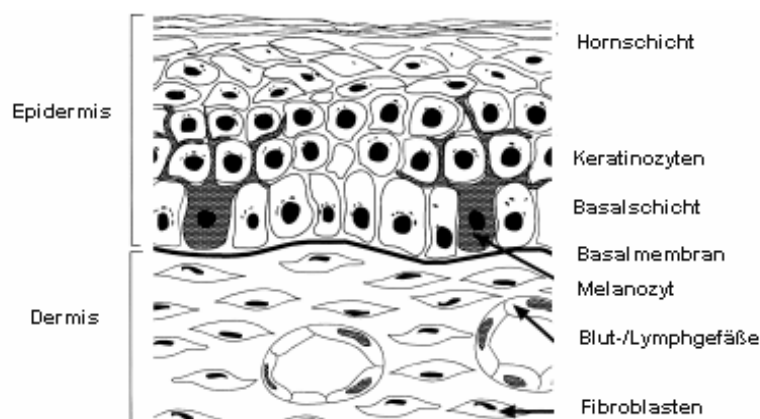


Abbildung 2: Aufbau der Haut mit Epidermis, Basalmembran und Dermis (modifiziert nach (Herlyn and Shih, 1994)).

Die Keratinozyten kontrollieren die Proliferation und das Wachstum der Melanozyten, die Hauptaufgabe der Melanozyten besteht in der Versorgung der Keratinozyten mit Melanosomen und dem darin enthaltenen Pigment Melanin. Dieses schützt die DNA der Keratinozyten vor schädlichem UV-Licht und den damit verbundenen DNA-Strangbrüchen (Hsu et al., 2002). Melanin wird in den Melanosomen der Melanozyten synthetisiert. Die Melanosomen werden dann über bisher ungeklärte Wege an die Keratinozyten abgegeben.

Das Schicksal der Zellen aus der Neuralleiste, ihr Überleben, ihre Bestimmung und ihre Migration hängen von einer Reihe von Signalwegen und Transkriptionsfaktoren ab (Hou et al., 2000). Signalwege, wichtig für die Entwicklung der Melanozyten, sind unter anderem der Wnt/ $\beta$ -catenin Signalweg (Dorsky et al., 2000; Ikeya et al., 1997), der MAP-Kinase-Weg mit dem Tyrosinkinaserzeptor cKit und seinem Ligand SCF (Cable et al., 1995; Chabot et al., 1988; Copeland et al., 1990; Geissler et al., 1988; Wehrle-Haller and Weston, 1995) und der cAMP-Signalweg (Busca and Ballotti, 2000). Zu den für die Melanozytenentwicklung

wichtigen Transkriptionsfaktoren gehören unter anderem MITF (microphthalmia associated transcription factor), ein Transkriptionsfaktor der helix-loop-helix-zipper-Transkriptionsfaktor-Familie (Hodgkinson et al., 1993), PAX3 (Paired Box Gene3) (Potterf et al., 2000; Watanabe et al., 1998) und Sox10 (Sry-Box 10) (Pingault et al., 1998; Potterf et al., 20). Im Weiteren werden die wichtigsten Signalwege detaillierter beschrieben. Auch wird auf die Rolle verschiedener Transkriptionsfaktoren in der Melanozytenentwicklung genauer eingegangen.

## **2.1.1 Signalwege in der Melanozytenentwicklung**

### **2.1.1.1 *Wnt/β-catenin-Signalweg***

Der Wnt/β-catenin Signalweg ist maßgeblich an der Differenzierung der Neuralleistenzellen zu Melanozyten beteiligt. Dies geschieht durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors MITF während der Melanozytenentwicklung (Dorsky et al., 1998): die Bindung des Wnt3a-Proteins an seinen Rezeptor führt zum Funktionsverlust von Glykogen-Synthase-Kinase beta3 (GSK3β) und als Folge zur Stabilisierung cytoplasmatischen β-catenins. Dieses wandert in den Zellkern und ermöglicht durch Interaktion mit den Transkriptionsfaktoren LEF1/TCF die Bindung des Komplexes an die LEF1/TCF Bindungsstelle im Promotorbereich von MITF und somit dessen Transkription (Cadigan, 2002; Dorsky et al., 2000).

Allerdings scheint GSK3β auch eine wesentliche Rolle in der Regulation von MITF-vermittelter Transaktivierung zu spielen. Takeda und Kollegen konnten zeigen, dass die Phosphorylierung von Ser298 durch GSK3β die DNA-Bindung von MITF an den Tyrosinase-Promotor verbessert (Takeda et al., 2000). Unklar ist bisher allerdings, welche Signalwege, außer dem Wnt/β-catenin-Signalweg an der Regulation von GSK3β beteiligt sind oder ob die Phosphorylierung von MITF auch durch andere Kinasen geschieht (Steingrimsson et al., 2004).

### **2.1.1.2 *Alpha MSH und der cAMP-Signalweg***

Zu den weiteren Faktoren und Signalwegen, die für die Promotor-Regulation von MITF wichtig sind, gehören das alpha-MSH (alpha-Melanocyte-stimulating hormone) und der cAMP-Signalweg (Busca and Ballotti, 2000). Alpha-MSH bindet und aktiviert den Melanocortin-Rezeptor MC1R, ein Mitglied der trimeren G-Protein-assoziierten Rezeptor-Familie. Die Aktivierung des Rezeptors führt über das alphaS gekoppelte G-Protein und die

Adenylyl-Zyklase zur vermehrten Synthese von intrazellulärem cAMP. Dessen Bindung an die Proteinkinase A bewirkt schließlich die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB (cAMP responsive element binding). Phosphoryliertes CREB bindet das CRE-Element im MITF-M Promotor und aktiviert dessen Genexpression. Die Melanozyten-spezifische Expression von MITF wird durch ein Zusammenspiel der verschiedenen Faktoren erreicht. Die Aktivierung des MITF-M Promotors durch den Transkriptionsfaktor CREB hängt zum Beispiel von der Bindung des HMG Box Proteins Sox10 an die Sox-Bindestelle im MITF-M Promotor ab (Steingrimsson et al., 2004). cAMP scheint aber nicht nur über CREB die Aktivierung des MITF-M Promotors zu regulieren: auch der MAP-Kinase-Weg und der PI3K-Signalweg werden durch cAMP angeschaltet und regulieren die Aktivität von MITF (Steingrimsson et al., 2004).

#### ***2.1.1.3 cKit- und der MAP-Kinase-Signalweg***

Beobachtungen zufolge spielt auch der cKit-Signalweg an der Regulation des MITF-Promotors eine Rolle (Hemesath et al., 1998). Allerdings scheint cKit nicht unbedingt an der frühen Entwicklung von Melanozyten und damit der frühen Expression von MITF beteiligt zu sein (Hou et al., 2000). Der cKit- Signalweg beinhaltet die Rezeptor-Tyrosinkinase Kit, deren Autophosphorylierung und die Aktivierung verschiedener Substrate wie die Mitogen-aktivierte Proteinkinase Erk-2 und die Serin-Threonin-Kinase p90Rsk. Die Kaskade endet in der Phosphorylierung von MITF an Ser73 durch Erk-2 und Ser409 durch p90Rsk (Hemesath et al., 1998). Die Phosphorylierung von Ser73 verstärkt das Transaktivierungspotential von MITF durch Rekrutierung des Coaktivators p300/CBP an die Phosphorylierungsstelle (Price et al., 1998). Die Bindung eines Kit-Liganden an seinen Rezeptor kann aber auch zur Ubiquitinylierung und anschließenden Proteasom-abhängigen Degradation von MITF führen (Xu et al., 2000).

### **2.1.2 Transkriptionsfaktoren in der Melanozytenentwicklung**

#### ***2.1.2.1 Der Transkriptionsfaktor MITF: Aufbau, Funktion, Expression***

MITF, dem Microphthalmia-associated-transcription-factor, wird, wie schon beschrieben, eine zentrale Rolle in der Entwicklung von Melanozyten zugeordnet (Lister et al., 2001; Planque et al., 1999; Tachibana et al., 1996). Außerdem ist MITF an der gewebsspezifischen Expression von Genen wie Trp-1, „Tyrosinase-related protein1“, Tyrosinase und Tbx2, „T-

Box factor 2“, beteiligt, die sowohl bei der Melanozytenentwicklung als auch bei der Pigmentierung der Melanozyten eine wichtige Rolle spielen. Die MITF-spezifischen Eigenschaften, der molekulare Aufbau und die Regulation der Aktivität von MITF werden hier ausführlich behandelt.

MITF ist ein Mitglied der Myc-Superfamilie, die den basic-helix-loop-helix (bHLH)-Zipper-Transkriptionsfaktoren angehört (Hodgkinson et al., 1993; Hughes et al., 1993). Es liegt beim Menschen auf Chromosom 3p12.3-14.1 und umfasst neun hochkonservierte Exone (Shibahara et al., 2001). Die Proteine zeichnen sich durch eine DNA-bindende Domäne, eine HLH- und eine Leucin- Zipper-Domäne aus, welche der Homo-/Heterodimerisierung dienen. Andere funktionelle Domänen von MITF umfassen Ubiquitinylierungs- und Phosphorylierungsdomänen für posttranskriptionelle Modifikationen und vier verschiedene Transaktivierungsdomänen (Mansky et al., 2002; Saito et al., 2003; Sato et al., 1997). Die Bindung von MITF an DNA über seine DNA-bindende Domäne erfolgt an der M- und der E-Box im Promotorbereich von Zielgenen. Die E-Box umfasst die Nukleotidsequenz CANNTG; die Bindung von Melanozyten-spezifischen Transkriptionsfaktoren erfordert zusätzlich am 5'-Ende der E-Box ein T oder am 3' Ende ein A (Aksan and Goding, 1998; Takemoto et al., 2002).

#### **2.1.2.1.1 Isoformen von MITF**

Bekannt sind bisher mindestens 6 Isoformen, MITF-A, -B, -C, -D, -H, und -M. Diese unterscheiden sich in ihrem Amino-Ende, werden von unterschiedlichen Promotoren reguliert und zum Teil. gewebespezifisch exprimiert: MITF-M wird hauptsächlich in Melanozyten der Neuralleiste und in Melanomzellen gefunden (Tachibana, 2000) und ist für die Melanozytenentwicklung des Auges und der Haut verantwortlich. MITF-A wird in kultivierten Zellen gefunden, wie zum Beispiel den Retinal Pigment Epithelium Zellen (RPE). MITF-H wird im Herz exprimiert. Auch MITF-C wird fast überall detektiert, nur nicht in Melanozyten. Abbildung 3 zeigt die verschiedenen Isoformen von MITF.

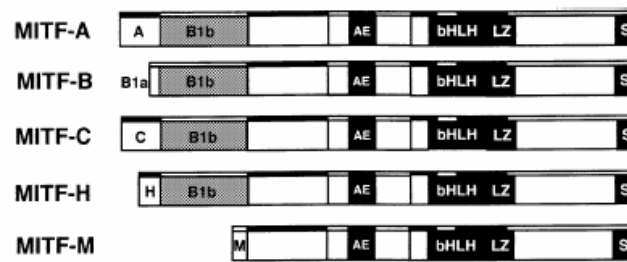


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Isoformen von MITF. Alle Isoformen unterscheiden sich in ihrem N-Terminus, gleichen sich aber in ihrem Carboxy-Ende. Zu sehen sind: AE: transkriptionelle Aktivierungs-domäne; Ser: Serin-reiche Region, bHLH-LZ: Helix-Loop-Helix Leucin-Zipper (Shibahara et al., 2001).

### 2.1.2.1.2 Regulation von MITF

Die Expression von MITF-M in der frühen Entwicklung von Melanoblasten ist für das Schicksal der melanozytären Linie essentiell: fehlt funktionsfähiges MITF-M-Protein, verschwinden die Vorläuferzellen der Melanoblasten und Melanozyten werden nicht gebildet (Opdecamp et al., 1997). MITF-M wird im Folgenden lediglich als MITF bezeichnet.

#### 2.1.2.1.2.1 Regulation von MITF über Transkriptionsfaktoren

Im Verlauf der Entwicklung wird die Expression von MITF stark durch verschiedene Transkriptionsfaktoren (Sox10, PAX3, CREB, LEF1) reguliert. Diese Faktoren spielen alle eine wesentliche Rolle in der Entwicklung der Melanozyten (Widlund and Fisher, 2003) und werden schon früh in der Melanozytenentwicklung exprimiert. Mutationen in den Faktoren PAX3, Sox10 und MITF führen zu verschiedenen Typen des Waardenburg-Syndroms (Pingault et al., 1998; Read and Newton, 1997) und damit zum Verlust von Melanoblasten und den damit einhergehenden Pigmentierungs- und Hördefekten. (Goding, 2000).

#### 2.1.2.1.2.2 Regulation von MITF über verschiedene Signalwege

Verschiedene Signalwege sind an der Regulation von Expression und Aktivität des Transkriptionsfaktors MITF beteiligt: der MAP-Kinase-Weg wie auch der Wnt/ $\beta$ -catenin Signalweg (Abbildung 4).

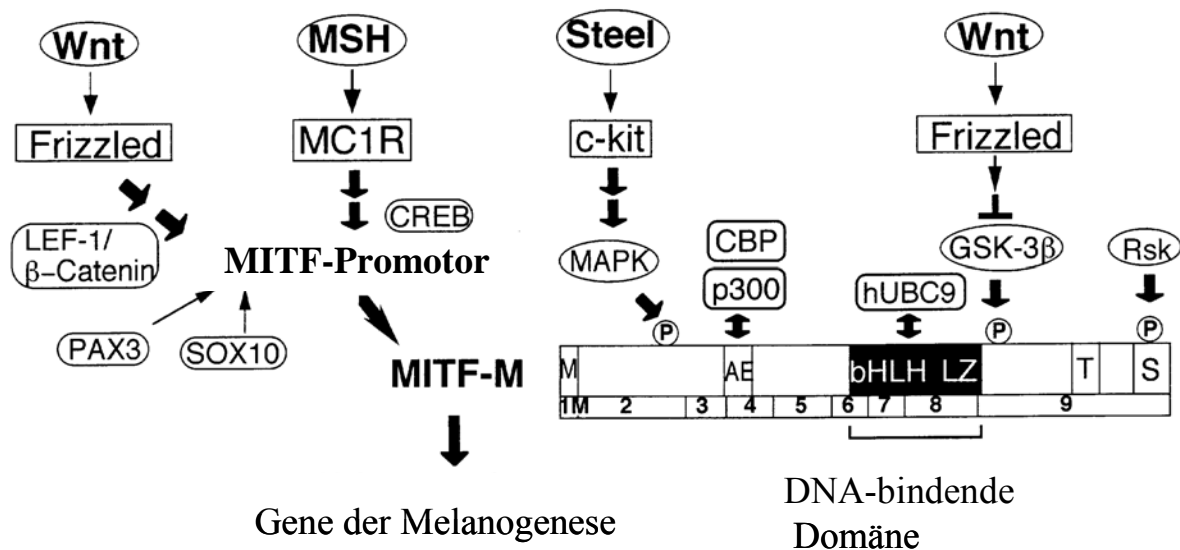


Abbildung 4: Schematisch dargestellt sind die unterschiedlichen Signalwege, die die Aktivität von MITF regulieren (Shibahara et al., 2001).

### 2.1.2.2 *PAX3, Sox10 und Brn-2 in der Melanozytenentwicklung*

Auch durch das Melanocortinpeptid MSH, den MC1-Rezeptor und den Transkriptionsfaktor CREB kann die Transkription von MITF induziert werden (zu den Signalwegen siehe Kapitel 1.1.3.1.). Abbildung 5 zeigt schematisch die verschiedenen Signalwege, die die Expression und die Aktivität von MITF regulieren.

PAX3 und Sox10 wurden bereits als wichtige Induktoren der Transkription des Transkriptionsfaktors MITF beschrieben (siehe Kapitel 1.1.3.2.1.3.1). PAX3 (Paired Box-3), ein Homeodomän-Transkriptionsfaktor, wird schon im Neuralrohr vor der Neuralleistenbildung exprimiert (Tassabehji et al., 1992) und ist in der Melanozytenentwicklung von großer Bedeutung. Zudem ist PAX3 an der Transkription von Trp-1 beteiligt. Sox10, ein Mitglied der HMG-Familie, ist in den früh-auswandernden Neuralleistenzellen zu finden und für das Überleben der undifferenzierten Zellen aus der Neuralleiste verantwortlich (Herbarth et al., 1998; Pusch et al., 1998; Southard-Smith et al., 1998). Sox10 kann an verschiedene Bindestellen im Promotorbereich von MITF-M binden und bei diesem die Transkription induzieren (Bondurand et al., 2000; Lee et al., 2000; Potterf et al., 2000). Auch ist Sox10 an der Induktion der Transkription der Dopachrom-Tautomerase (Dct) beteiligt (Potterf et al., 2001).

### 2.1.3 Melanogenese

Die Melanogenese umfasst die Synthese der Pigmente Phaeomelanin (gelb-rötliches Pigment) und Eumelanin (braun-schwarzes Pigment) in den membrangebundenen Melanosomen der Melanozyten, die Verteilung der Melanosomen in die Dendriten der Melanozyten und den daran anschließenden Transfer der Melanosomen zu den benachbarten Keratinozyten wahrscheinlich mittels Exozytose (Hearing, 1999; Virador et al., 2002).

Die Vorläufer der Melanosomen, die Prämelanosomen, stammen von Organellen des Endozytosewegs ab (Raposo and Marks, 2002). Die Entwicklung der Prämelanosomen zu reifen Melanosomen kann aufgrund ihrer morphologischen Eigenschaften in die Stadien I-IV unterteilt werden. Prämelanosomen I sind nicht pigmentiert und ähneln in ihrem Aussehen frühen multivesikulären Endosomen. Die Form der Prämelanosomen II gleicht einer Ellipse, das Innere wird von intralumenalen Strängen durchzogen, an denen in späteren Stadien Melanin polymerisiert und gelagert wird (Raposo and Marks, 2002).

Für die Entwicklung von Prämelanosomen zu reifen Melanosomen ist der Transport spezifischer Enzyme vom Trans-Golgi-Netzwerk in die Prämelanosomen essentiell (Raposo and Marks, 2002). Das integrale Membranprotein Pmel17 wird bereits in den frühen Prämelanosomen angereichert (Lee et al., 1996; Raposo and Marks, 2002), die pigment-relevanten Gene Trp-1 (Tyrosine-related protein-1), Dct (Dopachrome-Tautomerase) und Tyrosinase hingegen findet man erst in den späteren, pigmentierten Stadien (Lee et al., 1996; Novikoff et al., 1968; Orlow et al., 1993; Raposo et al., 2001). In Abbildung 5 sind die verschiedenen Stadien der Melanosomenentwicklung zu sehen.

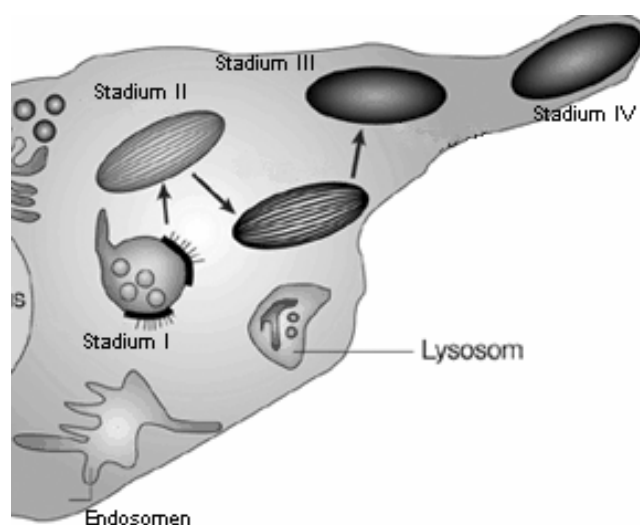


Abbildung 5 zeigt die vier Stadien der Melanosomenentwicklung: Die unreifen Stadien I und II, das Stadium III mit seinen Strängen, an denen das Melanin anlagert und schließlich das Stadium IV, das reife Melanosom (modifiziert nach (Marks and Seabra, 2001)).



### ***2.1.3.1 Enzyme der Melanogenese***

Für die Melanogenese wichtige Enzyme zur Umwandlung von Tyrosin zu Melanin sind Tyrosinase und die Tyrosinase-verwandten Proteine Tyrosinase-related protein-1 (Trp-1) und Trp-2/Dopachrom-Tautomerase (Dct). Ihre Expression ist fast ausschließlich auf Pigmentzellen beschränkt. Das Enzym Tyrosinase besitzt drei verschiedene Funktionen und ist essentiell für die ersten Schritte der Pigmentierung, Trp-2, das tyrosinase-related protein-2, fungiert als Dopachrom-Tautomerase und ist verantwortlich für die Bildung des braunen Melanins; Trp-1, das tyrosinase-related protein-1, fungiert als DHICA-Oxidase und ist wichtig für die Entstehung des schwarzen Melanins.

Die transkriptionelle Regulation der Tyrosinase sowie der Enzyme Trp-1 und Dct findet an einer definierten und konservierten Sequenz, der M-Box, im Promotorbereich ihrer Gene statt (Bertolotto et al., 1996; Ganss et al., 1994). Diese Box erkennt der Transkriptionsfaktor MITF, bindet an diese als Homodimer beziehungsweise Heterodimer mit TFE3, TFEB oder TFEC und initiiert dort die Transkription der Pigmentierungs-relevanten Gene (Bentley et al., 1994; Hemesath et al., 1994; Yasumoto et al., 1994). Der Promotor von Trp-1 kann aber auch über andere Faktoren reguliert werden, da der Promotorbereich von Trp-1 außer einer M-Box auch die zwei regulatorischen Elemente MSEu und MSEi besitzt. Beide Elemente werden sowohl von PAX3 als auch von dem Brachyury-related transcription factor Tbx2 erkannt und gebunden. PAX3 ist als Aktivator des Trp-1 Promotors bekannt, Tbx2 fungiert als Repressor der Transkription von Trp-1. Ein weiterer wichtiger Faktor ist Brn-2, ein Transkriptionsfaktor der Pou-Familie, welcher vor allem in der Entwicklung von Neuronen eine wichtige Rolle spielt. In Melanomzellen wird Brn-2 verstärkt exprimiert. Reguliert wird die Expression von Brn-2 sowohl über den MAP-Kinase-Weg (Goodall et al., 2004a) als auch den Wnt/ $\beta$ -catenin-Signalweg. Brn-2 kann sowohl an PAX3 wie auch an Sox10 binden (Smit et al., 2000) und ist an der Regulation der Pigmentierungs-relevanten Gene beteiligt (Smit et al., 2000).

### ***2.1.3.2 Auslösende Faktoren für die Initiierung der Pigmentierung***

Hauptauslöser der Melanogenese ist die UV-Strahlung: UV-Strahlung induziert die Bildung des Melanocortin-Peptids alpha-MSH. Dieses bindet an den MC-1 Rezeptor und fördert die Transkription des Transkriptionsfaktors MITF (siehe auch 2.1.3.1.2). MITF wiederum ist für die Aktivierung der Pigmentierungs-relevanten Gene Tyrosinase und Trp-1 verantwortlich (siehe 1.1.3.1.2). Die Bindung von alpha-MSH an seinen Rezeptor bewirkt eine verstärkte

Aktivität von Tyrosinase und die Bildung des Pigments Eumelanin. Die UV-induzierte Melanogenese schützt die Keratinozyten der Haut vor gefährlicher Strahlung.

## 2.2 Das Maligne Melanom

Das maligne Melanom („schwarzer Hautkrebs“) ist eine bösartige Tumorerkrankung, die aus den Pigment-bildenden Melanozyten der Haut hervorgeht und sich überwiegend in der Haut, aber auch im Auge, den Hirnhäuten und den Schleimhäuten manifestiert. Charakteristisch für das maligne Melanom ist seine Fähigkeit zur Metastasierung in unterschiedliche Organe wie Lunge, Leber, Haut und Gehirn, was letztendlich zum Tod führt. Es gibt vier verschiedene Melanomtypen, die sich in ihrer Größe, Form und Farbe voneinander unterscheiden: In Abbildung 1 sind die vier verschiedenen Melanomtypen aufgeführt: das superfiziell spreitende Melanom (SSM), das noduläre Melanom (NM), das Lentigo-maligna Melanom (LMM), das akrolentiginöse Melanom (ALM)

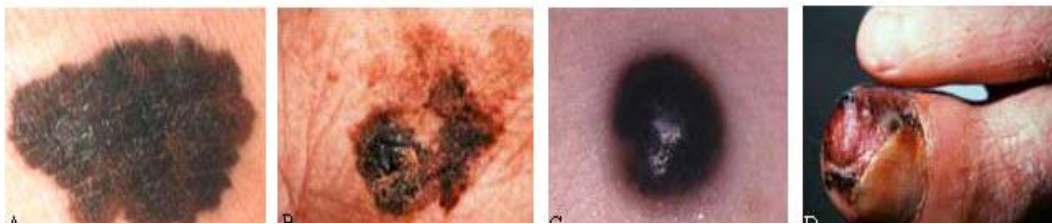


Abbildung 6: Die vier Haupttypen der Melanoms: A: SSM; B: LMM; C: NM; D: ALM  
([www.hautkrebs.de](http://www.hautkrebs.de))

Schätzungen der WHO (World Health Organization) zufolge kommt es jährlich zu ca. 200.000 neuen Melanomerkkrankung. Dieser Tumor gehört damit weltweit zu den häufigsten Krebserkrankungen (Ärzte-Woche, 15. Jg., Nr. 17, 2001). Die Überlebensrate ist in den letzten Jahren dank verbesserter Behandlungsmethoden stetig gestiegen (Schaffer et al., 2004). Heute liegt die 10-Jahres Überlebensrate bei Tumoren kleiner als 1mm Tiefe bei ca. 75-80%, bei Tumoren mit einer Größe von 1mm und größer bei nur noch 50% ([www.derma.de](http://www.derma.de)).

Als auslösende Faktoren gelten vor allem die UV-Exposition, wobei Stärke und Dauer der Strahlung sowie das Alter des Patienten eine wichtige Rolle bei der Entstehung des malignen Melanoms spielen. Auch Erbfaktoren, die Anzahl an Muttermalen und Leberflecken sowie der Hauttyp werden als Risikofaktoren immer stärker in Betracht gezogen (Tucker and Goldstein, 2003). Beobachtungen von Spontanremissionen und aggressiven Verläufen bei

immunsupprimierten Patienten messen immunologischen Faktoren in der Tumorprogression eine große Bedeutung bei (Kaufmann et al, 1989, Tilgen & Kaufmann 1995).

Dank etlicher Erkennungsmethoden und Klassifikationen wie der ABCDE-Regel kann das maligne Melanom frühzeitig diagnostiziert und behandelt werden. Hierbei spielen die **A**symmetrie des Aufbaus, die **B**egrenzung, die **C**olor (Farbe), der **D**urchmesser und die **E**rhobenheit des Pigmentflecks für die Diagnose eine wichtige Rolle.

Verschiedene Therapieansätze verlängern derzeit das Überleben von Melanompatienten, eine vollkommene Heilung gibt es nicht. Das therapeutische Vorgehen umfasst die chirurgische Exzision der betroffenen Stelle und die daran anschließende adjuvante Therapie. Bei dieser werden ableitende („sentinal“) Lymphknoten entfernt, um so ein Metastasieren des Tumors in weitere Organe zu verhindern. In seltenen Fällen kann sich die Gabe von Interferon alpha in bestimmten Tumorstadien positiv auf die Patienten auswirken. Selbst durch die Strahlentherapie kann man nur bedingt auf das Fortschreiten der Krankheit einwirken. Weitere Therapiemaßnahmen umfassen die Immuntherapie und die Chemotherapie. Bei der Immuntherapie werden Komponenten der körpereigenen Abwehr eingesetzt, um die entarteten Tumorzellen zu bekämpfen. Bei der Chemotherapie sollen Tumorzellen mit Hilfe zytostatischer Medikamente abgetötet werden. Doch trotz der vielen Therapieansätze gilt das maligne Melanom als unheilbar.

### **2.2.1 Melanomentstehung**

Die Entwicklung vom Melanozyten zur metastasierenden Melanomzelle wird nach Clark in fünf verschiedene Stadien eingeteilt. Als früheste, hyperplastische Läsion von Melanozyten wird der melanozytäre Nävus angesehen. Dieser kann selten spontan ausdifferenzieren (Schwannsche Differenzierung), manchmal aber auch entarten. Der dysplastische Nävus, die nächste Stufe der hyperplastischen Läsion, wird als Vorläufer des Hauttumors betrachtet. (Friedman et al., 1985). Das RGP-Melanom (radial-growth-phase) bildet die erste maligne Stufe in der Melanomentstehung (Hsu et al., 2002). Die Zellen breiten sich radial aus aber verbleiben noch in der Epidermis. Erst in der nächsten Stufe, dem VGP-Melanom (vertical-growth-phase), durchdringen die Melanomzellen die Basalmembran und gelangen in die Dermis und das subkutane Gewebe. Die Metastase schließlich bildet die letzte Stufe der Tumorprogression: einzelne Zellen haben sich abgesiedelt und in entfernten Geweben einen zweiten Krankheitsherd gebildet. Abbildung 7 skizziert die verschiedenen Stadien der Tumorentstehung.

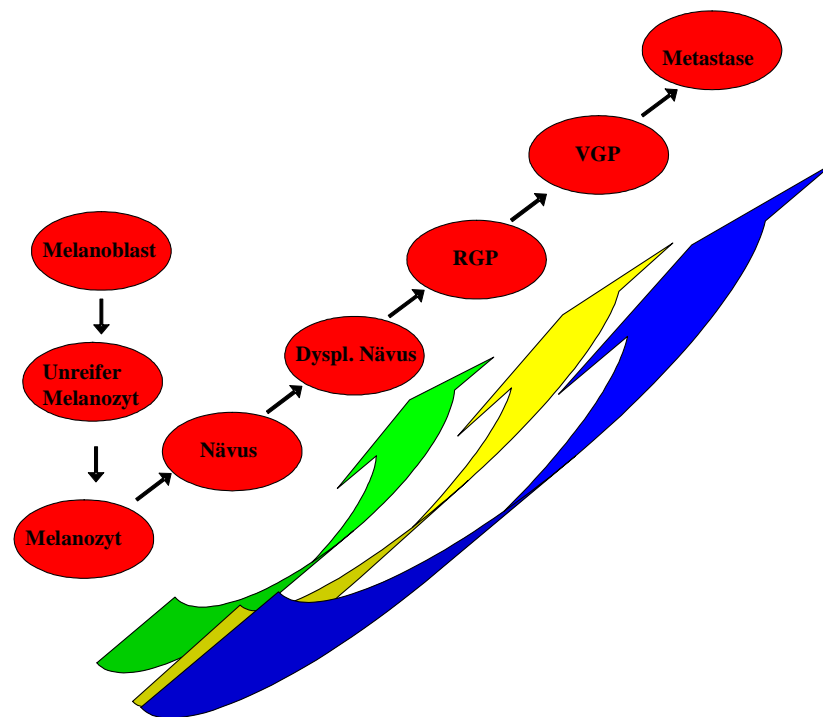


Abbildung 7: Die verschiedenen Stadien der Tumorentwicklung, angefangen vom Melanoblast, der sich über den unreifen Melanozyt zum reifen Melanozyten entwickelt. Aus den Melanozyten entstehen die Nävi, daraus die dysplastischen Nävi. Die erste maligne Stufe ist das RGP-Melanom, daraus entwickelt sich das VGP-Melanom und dann die Metastase. Inwieweit eine spontane Entartung der Melanozyten zum RGP-Melanom oder VGP-Melanom möglich ist, ist noch nicht bekannt (modifiziert nach (Meier et al., 1998)).

Die Tumorentwicklung geht mit einer Reihe von Veränderungen in der Zelle einher. Die Zelle entzieht sich der lokalen Wachstumskontrolle und Apoptosesignalen, sie verändert ihr Motilitäts- (Wanderungs-) und Adhäsionsverhalten und entwickelt neue Eigenschaften hinsichtlich Gewebeabbau (Matrixdegradation) und Immunabwehr. All diese Veränderungen sind mit Defekten in der Signaltransduktion, der Zellzykluskontrolle und der Deregulation von Wachstumsfaktoren verbunden. In den folgenden Kapiteln werden verschiedene Aspekte der Tumorentstehung hinsichtlich ihrer Genexpression genauer beschrieben.

### **2.2.1.1.1 Wachstumsfaktoren**

Wachstumsfaktoren können auf die Zelle wirken, die die Faktoren selbst synthetisiert hat (autokrin), oder auf die Zellen der Umgebung (parakrin). Nachfolgend werden einige Faktoren beschrieben, die im Melanom exprimiert werden, nicht jedoch in Melanozyten, und die zum Wachstum und Überleben des Tumors beitragen.

#### ***2.2.1.1.1.1 Autokrine Faktoren***

Der basic fibroblast growth factor (bFGF) wird für das Wachstum von Melanozyten und Melanomzellen benötigt. Melanozyten können diesen Faktor nicht selbst synthetisieren und sind auf exogenes bFGF angewiesen. Mit zunehmender Malignität jedoch ist die mRNA von bFGF in den Melanomzellen nachweisbar, der notwendige Wachstumsfaktor wird von der Melanomzelle selbst synthetisiert. bFGF ist jedoch nur für die Proliferation der Zellen verantwortlich, es führt jedoch nicht zur Transformation der Zellen (Dotto et al., 1989). bFGF ist nicht nur ein autokriner Wachstumsfaktor, er ist wahrscheinlich auch für die Tumorentwicklung als Angiogenesefaktor und als Aktivator von verschiedenen Proteasen wie uPA (Plasminogenaktivator) von wesentlicher Bedeutung (Nesbit et al., 1999).

TGF- $\alpha$  (Transforming growth factor alpha), ein Mitglied aus der Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren (EGF, Epidermal growth factor), bindet und aktiviert wie diese den EGF-Rezeptor. TGF- $\alpha$  wird von Melanomzellen exprimiert und korreliert mit deren Fähigkeit zur Metastasierung (Singh et al., 1995). Durch die exogene Gabe von TGF- $\alpha$  wird das Wachstum von Melanomzellen induziert. In wie weit TGF- $\alpha$  auch parakrine Funktionen aufweist, ist bisher noch nicht geklärt.

Die Proteine der TGF- $\beta$  Familie sind an der Wachstumsregulation, Wundheilung und Angiogenese beteiligt. Während der Tumorprogression steigen die Mengen an TGF- $\beta$  und die Aktivität von TGF- $\beta$  in Melanomzellen durch Autostimulierung des *tfgb1*-Genes an. (Akhurst and Derynck, 2001; Derynck et al., 2001). Dabei verliert TGF- $\beta$  seine Rolle als Wachstuminhibitor und Apoptose-induzierender Faktor, stattdessen fördert die zunehmende Synthese von TGF- $\beta$  die Migration und Invasivität der Melanomzellen, es ruft Veränderungen des Stromas hervor, induziert die Angiogenese und supprimiert das Immunsystem (Wakefield and Roberts, 2002). Die genaue Rolle von TGF- $\beta$  als autokriner Wachstumsfaktor ist noch nicht ausreichend bekannt.

#### **2.2.1.1.1.2 Parakrine Faktoren**

Verschiedene Faktoren dienen nicht vornehmlich dem Wachstum und der Proliferation der Melanomzellen selbst, sondern der Stimulation und dem Wachstum anderer Zellen. Sie induzieren so zum Beispiel die Angiogenese. Im Folgenden werden einige wichtige Faktoren erläutert, die für die Melanomentstehung von Bedeutung sind.

IGF-1 (Insulin-like growth factor) und Insulin fördern das Wachstum von Melanomen und deren Motilität. IGF-1 wird von Fibroblasten produziert, abgesondert und induziert so das Wachstum der Melanomzellen. Der Platelet-derived growth factor PDGF wird nicht von Melanozyten, aber von Melanomzellen exprimiert. Aufgrund geringer Mengen an PDGF-Rezeptoren auf Melanomzellen wird davon ausgegangen, dass PDGF keine autokrine Funktion erfüllt, sondern auf umgebendes Gewebe Einfluss nimmt. PDGF reguliert die Migration und die Proliferation von Zellen. Außerdem induziert PDGF die Angiogenese und ist somit für die Versorgung des Melanoms mit Blutgefäßen verantwortlich. Zu den Wachstumsfaktoren, die hauptsächlich parakrine Funktionen haben, gehört das Interleukin (IL) 1. IL-1 wird von Melanomzellen exprimiert und induziert die Expression von VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) und ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) auf Endothelzellen. Es fördert so die Interaktion von Melanomzellen und Endothelzellen. Diese Interaktion induziert die Invasion der Melanomzellen in das umliegende Gewebe. Auch induziert IL-1 die Expression von TGF- $\alpha$  und IL-6. IL-6 und TGF- $\alpha$  wirken auf metastasierende Melanomzellen stimulierend (siehe autokrine Wachstumsfaktoren).

#### **2.2.1.1.2 Zelladhäsionsmoleküle**

Die Zelladhäsion spielt eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung von Zelle zu Zelle, der Adhäsion der Zellen an die Extrazelluläre Matrix (EZM) und der Migration von Zellen an den Endothelien entlang. Die Zelladhäsion ist an der Entstehung von Tumoren wesentlich beteiligt. Im Folgenden werden einige Adhäsionsmoleküle herausgegriffen und näher erläutert.

##### **2.2.1.1.2.1 Zell-EZM Interaktionen durch Integrine**

Integrine sind Heterodimere. Sie sind aus einer  $\alpha$  und einer  $\beta$  Untereinheit aufgebaut. Es gibt mindestens 24  $\alpha$  und 9  $\beta$  Untereinheiten. Mit ihrer extrazellulären Domäne binden Integrine an spezifische Komponenten der EZM, während die intrazelluläre Domäne mit Regulatoren des

Aktinzytoskeletts verknüpft sind. Des weiteren fungieren Integrine auch als Rezeptormoleküle und fördern die Proliferation und die Regulation anti-apoptotischer Signalwege (Hynes, 2002).

Während der Progression von Melanomen werden verschiedene Integrine wie  $\alpha\text{v}\beta 3$ ,  $\alpha 2\beta 1$  und  $\alpha 4\beta 1$  stark exprimiert. Die Expression von  $\alpha\text{v}\beta 3$  korreliert mit dem Übergang der Zellen von der „radial-growth-phase“ (RGP) zur „vertical-growth-phase“ (VGP) (Van Belle et al., 1999) und beeinflusst die Invasivität der Melanomzelle. Die Expression von  $\alpha 4\beta 1$  vermittelt die Adhäsion der Melanomzellen an die Endothelzellen und fördert so die Extravasation der Melanomzellen aus den Blutgefäßen.

#### ***2.2.1.1.2.2 CAMs: Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle aus der Familie der Immunglobuline***

Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle vermitteln die Adhäsion an sich selbst (homophil) und auch an andere Liganden (heterophil). Sie fungieren so auch als Rezeptoren für Integrine und Moleküle der EZM und fördern und regulieren den Informationsaustausch zwischen den Zellen, indem sie mit Kinasen und Wachstumsfaktoren interagieren (Meier et al., 2003). Eines dieser Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle ist MCAM, auch bekannt unter den Namen MUC18, Mel-CAM und CD146. MCAM wird in über 80% der Melanome und Metastasen exprimiert, seine Expression steigt mit zunehmender Tumordicke an (Johnson et al., 1997). Zudem ist die Expression von MCAM mit dem Tumorwachstum, der Reorganisation des Zytoskeletts und der Metastasierung von Melanomzellen korreliert (Anfosso et al., 1998). Ein weiteres Tumor-assoziiertes Molekül aus der Familie der Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle ist ICAM-1. Auch dieses wird verstärkt in Melanomzellen exprimiert, seine Expression steigt mit zunehmender Tumordicke an (Johnson et al., 1989). N-CAM und das L1-Adhäsionsmolekül sind weitere Vertreter der CAM-Familie, die verstärkt in Melanomen exprimiert werden (Pandolfi et al., 1992).

#### ***2.2.1.1.2.3 Cadherine***

Cadherine gehören in die Familie der Transmembran-Glykoproteine. Sie sind an der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Zell-Zell-Adhäsion beteiligt und bilden den Kontakt zwischen Keratinozyten und Melanozyten. Keratinozyten kontrollieren über E-Cadherin die Proliferation von Melanozyten (Hsu et al., 2002). Die reduzierte Expression von E-Cadherin im malignen Melanom korreliert mit ansteigender Aggressivität und zunehmender Dedifferenzierung der Zellen. Von Melanomzellen wird E-Cadherin nicht exprimiert: sie entgehen damit der Kontrolle durch die

Keratinocyten (Hsu et al., 1996). Stattdessen wird das Molekül N-Cadherin von Melanomzellen exprimiert: N-Cadherin unterstützt die Zellmotilität und fördert die Invasion und Metastasierung der Melanomzellen. Der Cadherin-Wechsel („switch“) von E- zu N-Cadherin in den Melanomzellen fördert die Interaktion der Melanomzellen mit Zellen des Stromas wie den Fibroblasten und den Endothelzellen (Peinado et al., 2004).

### **2.2.1.1.3 Transkriptionsfaktoren**

Unzählige Proteine sind am Tumorwachstum und an der Tumorentstehung beteiligt. Reguliert wird die Expression der Gene, die Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose beeinflussen, über eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel AP-1. AP-1 setzt sich zusammen aus den Faktoren fos und jun. Beide Faktoren werden in metastasierenden Melanomzellen stärker exprimiert als in Melanozyten. Reguliert wird AP-1 über den MAP-Kinase-Signalweg (Englaro et al., 1995; Yamanishi et al., 1991). Ein weiterer Faktor, der das Tumorwachstum fördert, ist der Transkriptionsfaktor AP-2. AP-2 ist ein Helix-Turn-Helix-Protein. Zielgene von AP-2 sind für die Differenzierung, Progression, Apoptose und das Wachstum von Zellen verantwortlich und umfassen zum Beispiel cKIT, E-Cadherin, und Bcl-2. In Melanomzellen wird AP-2 kaum exprimiert: eine reduzierte AP-2 Expression im Melanom wird mit steigendem Metastasierungspotential in Zusammenhang gebracht (Huang et al., 1998). CREB, das cAMP-responsive element binding protein 1 ist ein Leuzin-Zipper Transkriptionsfaktor. Auch die Expression von CREB wird mit zunehmender Malignität korreliert. Der Transkriptionsfaktor Ets-1, ein positiver Regulator von Progressions-relevanten Genen, zeigt eine starke Expression in Melanomzellen im Vergleich zu Melanozyten (Keehn et al., 2003).

### **2.2.2 Das Protein MIA (Melanoma Inhibitory Activity)**

Das Protein MIA (Melanoma Inhibitory Activity) ist ein kleines Molekül von 11 kDa, das von Melanomzellen, nicht jedoch von Melanozyten produziert und sekretiert wird. Das *mia* Gen liegt im humanen Genom auf Chromosom 19q13.32-13.33 (Koehler et al., 1996). Es weist eine hoch konservierte Exon-Intronstruktur mit 4 Exonen auf; die mRNA hat eine Länge von ca. 2kb (Bossert et al., 2002). Eine SH3-Domäne, ein beta-Faltblatt und zwei Disulfidbrücken bilden die Struktur des Proteins (siehe Abbildung 8).



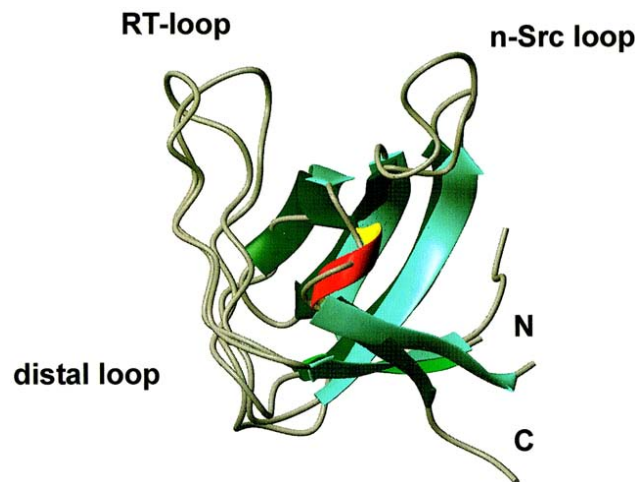


Abbildung 8: Die Struktur des Proteins MIA (Melanoma Inhibitory Activity) (Stoll et al., 2001).

Reguliert wird die Transkription von MIA über den Transkriptionsfaktor HMG-1, der spezifisch an ein cis-regulatorisches Element im Promotorbereich bindet und der im Melanom stark exprimiert wird (Poser et al., 2003). Angrenzend an die HMG1-Bindestelle befindet sich ein Silencer Element, das die Expression von MIA in Melanozyten durch die Bindung des transkriptionellen Repressor CtBP1 verhindert. Im Melanom kommt es zum Verlust von CtBP1 – die Transkription von MIA wird somit nicht mehr inhibiert (Poser et al., 2002). Ursprünglich wurde die Expression von MIA in den Melanomzellen mit der Inhibierung des Tumorwachstums assoziiert (Blesch et al., 1994). Dieser ursprünglichen Funktion verdankt das Protein seinen Namen.

In Studien konnte gezeigt werden, dass MIA an der Invasion und Metastasierung von Melanomzellen beteiligt ist: durch Bindung der SH3-Domäne von MIA an Komponenten der extrazellulären Matrix wie Fibronectin und Laminin verhindert es die Anheftung der Melanomzellen an die EZM. Bosserhoff und Kollegen konnten außerdem zeigen, dass die Menge an MIA Protein im Serum von Patienten als Tumornachweis und Therapiekontrolle gewertet werden kann. (Bosserhoff et al., 1996).

### ***2.3 Ziel der Arbeit***

Das maligne Melanom gilt aufgrund seines hohen Metastasierungspotentials in andere Organe als der bösartigste Hauttumor. Therapieansätze erweisen sich häufig als nutzlos, die Heilungschancen gelten als gering. Viele Fragen bezüglich seiner Entstehung, seiner Progression und seiner Metastasierung sind derzeit noch offen. Auf der Suche nach Genen und Proteinen, die an der Tumorentstehung beteiligt sein könnten, konnte das Protein MIA im Überstand von Melanomzellen ausgemacht werden. Weitere Daten belegten, dass MIA an der Invasion und Metastasierung von Melanomzellen beteiligt ist (siehe oben). Das Ziel dieser Arbeit war das Auffinden von Genen, die durch die Expression und Sekretion des Proteins MIA positiv wie negativ reguliert und beeinflusst werden. Weiter sollten diese Gene auf ihre Funktion bei der Entstehung des malignen Melanoms untersucht werden. Hier galt es herauszufinden, welche Prozesse durch die differentiell regulierten Gene an- oder abgeschaltet werden, in wie weit sie für die Prozesse der Tumorentwicklung von Bedeutung sind oder auf welche Weise sie zur Entartung von Melanozyten und zu Veränderungen des Zellverhaltens führen.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Allgemeine Materialien

BD Discovery Labware Falcon™, Boston, USA	Einmalartikel für Zellkultur, Polystyrene Round-Bottom Tube
Behrens, Hamburg	Agar
Biochrom AG, Berlin	Phenolrot
BioRad, Richmond, USA	Immun- Blot™ PVDF Membran
Calbiochem San Diego, USA	PD98059, UO 126
Cell Signaling Technology, Inc., Berverly, MA, USA	Anti P44/42 MAP Kinase Antikörper Anti Phospho-p44/42 MAP Kinase Antikörper
Chemicon International, Inc. Temecula, CA, USA	Anti-Integrin alphav beta3 (MAB 1976)
BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, ME USA	SeaKem® LE agarose
Invitrogen, California, USA	SuperScript™ II RNase H <sup>-</sup> Reverse Transkriptase, SeeBlue® Plus2, Ready- Load™ 100 bp DNA Ladder, pcDNA3 Vektor, pcDNA3.1/ V5-His- TOPO Vektor, Lipofectamine PLUS™ Reagent, Lipofectamine™ Reagent, pcR/CMV Vektor
Lab Vision (NeoMarkers) Corporation, Fremont, CA, USA	Anti-Microphthalmia Ab-1
MWG Biotech, Martinsried	Oligonukleotide
PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach	DMEM, RPMI, Fötales Kälberserum, Trypsin, PBS, Penicillin/ Streptomycin
Pierce, München	BCA Protein Assay Kit
Promega, Heidelberg	Dual –Luciferase® Reporter Assay System, pRL- TK Vektor, LacZ Vektor, pGL-3-Promotor Vektor, pGL3-basic Vektor, PureYield™ Plasmid Midiprep System
PromoCell, Heidelberg	Melanocyte Growth Medium

Qiagen, Hilden	HiSpeed™ Plasmid Midi Kit, RNeasy® Mini Kit, QIAquick® Gel Extraction Kit
Riedel de Haen, Seelze	Ethanol, Methanol
Roche Diagnostics, Mannheim	Restriktionsendonukleasen, Taq-Polymerase, Ethidiumbromid, RNase A, LightCycler DNA Master SYBR Green I, Primer 'random' (#1034731), LightCycler Capillaries, SuRE/ Cut Buffer for Restriktion Enzymes, COMPLETE-Proteinaseinhibitormix, Nonidet® P40, MIA-ELISA Kit
Roth, Karlsruhe	Roti® Load1 4x- Konz., Roti® Load 4x, nicht denaturierend
Santa Cruz, Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA	Anti-Tyrosinase Antikörper
Sigma, St. Louis, USA	Acrylamid 40% Lösung, Bromphenolblau, Trypsin, BSA, TEMED, Monoclonal Anti-β-Actin Antikörper
Sigma Genosys, Cambridge, England	Oligonukleotide
Stratagene, Heidelberg	Epicurian Coli® XL2- Blue MRF' Ultracompetent Cells
Transduction Laboratories, Lexington, England	Anti- N-Cadherin Antikörper Anti-E-Cadherin Antikörper
Whatman International Ltd, Maidstone, England	Whatman 3MM Filterpapier, Nucleopore® Track-Etch Membrane
Zymed Laboratories Inc, San Francisco, USA	BCIP/NBT Substrate Kit

### 3.1.2 Geräte

#### Blotapparaturen:

Whatman Biometra, Göttingen	Minigel Twin, Fastblot B34
-----------------------------	----------------------------

#### Gelelektrophoreseapparaturen:

Amersham pharmacia biotech	Elektrophoresis Power Supply EPS 301
----------------------------	--------------------------------------

BioRad, München

Wide Mini Sub<sup>®</sup> Cell GT**Heiz- und Kühlblöcke:**

Eppendorf, Hamburg

Thermomixer 5436, Thermomixer comfort,  
Thermomixer compact**Mikroskope:**

Leitz, Wetzlar

Labovert FS, Aristoplan

Zeiss, Jena

Axiovert 10, ICM 405

**Spannungsgeräte:**

BioRad, München

Modell 200/2.0 power supply, Consort E455

**Waagen:**

Sartorius, Göttingen

R160P, L2200S

**Zentrifugen:**

Eppendorf, Hamburg

Centrifuge 5415C, MiniSpin Plus

Hereaeus, Hanau

Biofuge 13, Biofuge 22R, Megafuge 1.0

Kisker, Steinfurt

Tischzentrifuge

Roche Diagnostics, Mannheim

LC Carousel Centrifuge

**Sonstige Geräte:**

Bachofer, Reutlingen

UV-Transilluminator IL 350 K, 254 nm

Bühler, Edmund, Tübingen

Schüttler SM 25

Heidolph, Kehlheim

Magnetrührer MR 2000, MR 2002, Vortexer  
REAX 2000

Kendro Laboratories, Hanau

Herasafe, Sicherheitswerkbank, KS, Zellinkubator  
CO2- Auto- Zero

IKA-Labortechnik, Staufen

Schüttler IKA-Vibrax VXR

MJ Research, Waltham, USA

Peltier Thermal Cycler PTC- 200

Roche Diagnostics, Mannheim

LightCycler II

Tuttnauer/Systec, Wetzlar

Autoklav 2540 EK

WTW, Weilheim

pH-Meter pH522

### 3.1.3 Organismen

Epicurian Coli® XL2- Blue MRF<sup>+</sup>                      Ultracompetent Escherichia Coli

### 3.1.4 Säugerzelllinien

HMB2	Melanomzelllinie, gewonnen aus einer humanen Melanommetastase
HMB2 -5	Humane Melanomzelllinie, stabil transfiziert mit antisense MIA
HMB2 -8	Humane Melanomzelllinie, stabil transfiziert mit antisense MIA
HMB2lacZ3	Humane Melanomzelllinie, stabil transfiziert mit LacZ
Melanozyten	Humane primäre Melanozyten aus normaler Haut

#### Vektoren: Vektorkarten siehe Anhang

pCL-neo-6 Myc-PIAS3	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Hideyoshi Yokosawa, Hokkaido University, Japan
pCMX-ASPIAS3	Eigene Herstellung
pCMX-PL1	Konstrukt aus pUC19 und CDM8
pCMX-ASMIA	(Blesch et al., 1994)
pKJ/ΔR	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Ilona Skerjanc, University of Western Ontario, Canada
pcR/CMV-MITF-M	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M Rehli, Regensburg
pKJ/PAX3	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Ilona Skerjanc, University of Western Ontario, Canada

### 3.1.5 Antikörper

Anti-Brn-2 Antikörper	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von C. Goding, Surrey, UK
Anti-Tbx2 Antikörper	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von C. Goding, Surrey, UK

### 3.1.6 Oligonukleotide

Primer für RT-PCR und quantitative PCR

Die Oligonukleotide wurden von der Firma SIGMA Genosys, England synthetisiert. Es wurde eine 100µM Stammlösung der Oligonukleotide durch Lösen in H<sub>2</sub>O hergestellt und bei –20°C gelagert.

β-Actin	For: 5'-CTACGTGGCCCTGGACTTCGAGC-3' Rev: 5'-GATGGAGCCGCCGATCCACACGG-3'
Brn-2	For: 5'-TGGAGCAGTTCGCCAAGCAG-3' Rev: 5'-TGACGCTCACCTCGATGGAG-3'
MITF	For: 5'-CTTGAAATGCAGGCTCGAGCTCATG Rev: 5'-CCGAGGTTGTTGTTGAAGGTGATGG
PAX3	For: 5'-GTCTCCAAGATCCTGTGCAG-3' Rev: 5'-ATGCGGCTGATGGAAGTC-3'
PIAS3	For: 5'-TCAAGGTCAATGGGAAACTG-3' Rev: 5'-GCCTCACCAGGTACACAGAC-3'
Tbx2	For: 5'-ACCAGTTCCACAAGCTAG-3' Rev: 5'-TTAGCCATCCACTGCTCC-3'
Tbx3	For: 5'-CATTCAGTCCAGTTCAGGC-3' Rev: AACCACGCCAAGAAGACAGG-3'
Trp-1	For: 5'-GCCCCAACTCTGTCTTTTCTCAA Rev: 5'-GATCGGCGTTATACCTCCTTAGC
Tyrosinase	For: 5'-GGGCCCCAAATTGTAGAGAGAAGC Rev: 5'-CTGCCAGGAGGAGAAGAAGAAGGATG
ITGB3 for.	For: 5'-ACACTGGCAAGGATGCAGTGAATTGTAC-3' Rev: 5'-CGTGATATTGGTGAAGGTAGACGTGGC-3'

### **3.2 Medien, Antibiotika und Puffer**

#### **3.2.1 Medien zur Anzucht von E.coli und Säugerzellkulturen**

Luria Bertani Medium	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl Substanzen wurden in dest.H <sub>2</sub> O gelöst und autoklaviert Für Platten: + 15g/l Agar Zur Selektion: + 100µg/ml Ampicillin
DMEM	Pulver wurde in demineralisiertem Wasser gelöst, der pH mit NaHCO <sub>3</sub> auf 7,3 eingestellt, und sterilfiltriert; Zusätze: 10% (v/v) FKS 0,1% (w/v) Penicillin/Streptomycin 0,0005% (w/v) Phenolrot
Einfriermedium	Pro 100ml: 50ml DMEM (mit 10% FKS) 30ml FKS 20ml DMSO

#### **3.2.2 Antibiotika**

Ampicillin-Stammlösung (500x)	50 mg/ml in dest. H <sub>2</sub> O (-20°C)
Geneticin- Stammlösung	100 mg/ ml in dest. H <sub>2</sub> O (-20°C)

#### **3.2.3 Puffer und Lösungen**

RNAse A Lösung	10 mM Tris/ HCl pH 7,0 10 mg/ ml RNAse A bei 95°C 10min
----------------	---



**Lösungen für Agarose-Gelelektrophorese (DNA-Auftrennung):**

TAE (50x)	2 M Tris/Acetat pH 8,0 50 mM EDTA
DNA-Agarosegel	1-2% (w/v) Agarose gelöst in TAE (1x)
DNA-Gel-Ladepuffer (10x)	0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylencyanol 40% (v/v) Sucrose
Ethidiumbromidlösung	0,04% in H <sub>2</sub> O bidest

**Lösungen für die Zellkultur:**

PBS (Phosphate buffered saline)	PBS ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> wurde in destilliertem Wasser gelöst; der pH-Wert mit NaHCO <sub>3</sub> auf 7,6 eingestellt; die Lösung sterilfiltriert
---------------------------------	---

**Lösungen für die Plasmidisolierung aus *E.coli*:**

Lösung I	50 mM Glukose 25 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA
Lösung II	0,2 M NaOH 1% SDS
Lösung III	60ml 5 M NaOAc 11,5ml Eisessig 28,5ml H <sub>2</sub> O

**Lösungen und Gele für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Proteinauftrennung):**

SDS-Page-Laufpuffer	25 mM Tris/HCl pH 8,5 200 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
12,5%-Trenngel	31,25% (v/v) Acrylamid:Bis 40% 37,5% (v/v) 1 M Tris pH 8,8 0,1% (v/v) SDS 0,05% (v/v) APS 0,05% (v/v) TEMED

4%-Sammelgel	10% (v/v) Acrylamid:Bis 40%
	12% (v/v) 1 M Tris pH 6,8
	0,1% (v/v) SDS
	0,05% (v/v) APS
	0,05% (v/v) TEMED

### **Lösungen für Western Blot:**

Western Blot-Transferpuffer	10% (v/v) Methanol
	25 mM Tris
	190 mM Glycin
PBS (10x)	80g/l NaCl
	2,0g/l KCl
	14,4g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	2,4g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	mit HCl auf pH 7,4 eingestellt, autoklaviert
Blockierungslösung	3% BSA in PBS

### **Lösung zur Isolation von Gesamtprotein**

RIPA Puffer	50 mM Tris- HCl, pH 7,5
	150 mM NaCl
	1% Nonidet® P40
	0,5% Natriumdesoxycholat
	0,1 % SDS
	COMPLETE-Proteinaseinhibitormix

### **3.3 Methoden**

Alle molekularbiologischen Arbeiten, Arbeiten mit Bakterien und Säugerzellen wurden in sterilen Gefäßen und mit sterilen Lösungen durchgeführt. Experimente, bei denen nicht explizit die Reaktionstemperaturen angegeben werden, fanden bei Raumtemperatur statt.

#### **3.3.1 Arbeiten mit Escherichia Coli**

##### **3.3.1.1 Kultivierung von Bakterien**

Der Bakterienstamm XL1-Blue wurde sowohl auf festen Nährboden als auch in Schüttelkultur kultiviert. Für die Selektion transformierter Bakterien wurde das Medium beziehungsweise die Nährplatte je nach Resistenzgen auf dem Plasmid, mit einem Selektionsantibiotikum versetzt (Ampicillin beziehungsweise Kanamycin). Zum Animpfen von Schüttelkulturen wurde eine Einzelkultur mit einer sterilen Spitze gepickt, bei Agarplatten wurden die Bakterien mit einem sterilen Trigalsky Spatel ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37°C im Brutschrank, die der flüssigen Kulturen bei 37°C im Schüttler bei 250 rpm.

##### **3.3.1.2 Transformation von E.coli**

Zur Transformation kompetenter E.coli wurden je 100ng Plasmid- DNA zu 100µl kompetenten Zellen, die auf Eis aufgetaut wurden, zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert und dabei gelegentlich durch leichtes Schütteln durchmischt. Anschließend wurden die Zellen einem einminütigen Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt, um die Plasmidaufnahme ins Zellinnere zu ermöglichen. Nach dem Hitzeschock kühlte man die Bakterien eine Minute auf Eis ab, gab pro Ansatz 500µl LB Medium zu und lies die Kultur 60 Minuten lange bei 37°C unter Schütteln anwachsen. Die transformierten E.coli wurden dann fünf Minuten bei 4000 U/min abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Bakterien im verbleibenden Medium wieder resuspendiert, um eine Aufkonzentrierung zu erreichen. Das Ausplattieren der Zellen erfolgte auf einem selektierenden Medium mit dem Antibiotikum, für das ein Resistenzgen in der eingebrachten Plasmid- DNA vorlag.

##### **3.3.1.3 Herstellung kompetenter Bakterien**

E.coli Bakterien können durch Behandlung mit Kalziumchlorid bei niedriger Temperatur in die Lage versetzt werden, freie DNA aus dem Medium aufzunehmen. Die Bakterienkultur

(E.coli BMH-71-18) wurde in LB-Medium bei 37°C so lange kultiviert, bis die Bakterienlösung eine optische Dichte (OD<sub>650</sub>) von 0.2-0.5 hatte. Die Zellen wurden nach Erreichen der Zelldichte für 5min auf Eis inkubiert, anschließend durch Zentrifugation bei 4000UpM über 10min bei 4°C geerntet, und das Pellet in 20ml eiskalter 50mM Kalziumchlorid-Lösung resuspendiert. Nach einer Inkubation auf Eis für 20min wurden die Zellen erneut zentrifugiert (4000UpM, 10min, 4°C) und anschließend in 4ml eiskalter 50mM Kalziumchlorid-Lösung resuspendiert. Für die Lagerung der Bakterien bei -80°C wurden 3,4ml der Bakteriensuspension (in 50mM Kalziumchlorid-Lösung) mit 0,6ml sterilem Glycin vermischt und jeweils 200µl der Bakteriensuspension in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### **3.3.1.4 Isolierung von Plasmid DNA**

Die Isolierung der Plasmid DNA erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Es wurden 3ml steriles LB Medium mit Selektionsantibiotikum mit einer Einzelkolonie von der Agarplatte angeimpft und bei 37°C und 250 rpm über Nacht auf dem Schüttelinkubator herangezogen. 1,5ml der Schüttelkultur wurden bei 4000 U/ min. abzentrifugiert, das Kulturmedium entfernt und das Bakterienpellet in 100µl der Lösung I (siehe 2.2.3 Lösungen für Plasmidisolierung) resuspendiert. Nach einer fünfminütigen Inkubation auf Eis werden 200µl der Lösung II zur Lyse der Bakterien zugegeben und zur Durchmischung das Gefäß vorsichtig geschwenkt. Dieser Schritt ermöglichte die spätere Abtrennung der Plasmid-DNA von Proteinen und chromosomaler DNA: Proteine wurden durch SDS denaturiert, DNA durch das alkalische Milieu. Um denaturierte Proteine zu entfernen, folgte die Zugabe von 150µl der Lösung III und eine 3- 5 minütige Inkubation auf Eis. Die Sedimentation der dabei präzipitierten Proteine und Membranbestandteile mit der daran anhaftenden chromosomalen DNA erfolgte mittels Zentrifugation bei 13000 U/ min für 5 Minuten. Der Überstand der Zentrifugation wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 900µl 100%igem Ethanol gefällt. Dazu wurde 10 Minuten auf Eis inkubiert und 10 Minuten bei 13000 U/ min abzentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wird verworfen und das Plasmid- DNA Pellet in der Speedvac Zentrifuge 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Nach der Trocknung wird das Pellet in 10µl eines H<sub>2</sub>O und RNase Mixes (120µl H<sub>2</sub>O + 5µl RNase A) resuspendiert und bei 37°C etwa 20 Minuten geschüttelt, um störende RNA aus dem Präparat zu entfernen.

### **3.3.1.5 Isolierung von Plasmid DNA im größeren Maßstab (Midipräparation)**

Für die Midipräparation wurden 50ml steriles LB Medium mit Selektionsantibiotikum mit 50µl Bakteriensuspension aus der Minipräparation angeimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttelinkubator herangezogen. Die eigentliche Plasmidisolierung erfolgte mit dem HiSpeed™ Plasmid Midi Kit der Firma Qiagen beziehungsweise Promega nach der beiliegenden Isolationsanleitung. Die Plasmid –DNA wurde mit 500µl H<sub>2</sub>O eluiert und bei –20 °C gelagert. Die Ausbeuten lagen etwa bei 150 bis 250µg Plasmid DNA pro 50ml Bakterienkultur.

## **3.3.2 Molekularbiologische Methoden**

### **3.3.2.1 DNA Techniken**

#### **3.3.2.1.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Die Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen zu analytischen Zwecken erfolgte meist in einem Volumen von 10µl mit etwa 0,5µg Plasmid-DNA, 5U des entsprechenden Enzyms und 1µl des vom Hersteller empfohlenen 10x Reaktionspuffers. Die Ansätze wurden für 1-2h bei der optimalen Reaktionstemperatur inkubiert und anschließend mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

#### **3.3.2.1.2 Gelelektrophorese von DNA**

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten für analytische Zwecke erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese (0,8-2% Agarose in TAE). Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 10V/cm durchgeführt. Das Anfärben der DNA erfolgte nachträglich in Ethidiumbromidlösung (0,04%) für 10-30min. Die angefärbte DNA wurde durch UV-Licht sichtbar gemacht. Die Größe der Fragmente konnte aufgrund eines ebenfalls auf das Gel aufgetragenen DNA-Längenstandards abgeschätzt werden.

#### **3.3.2.1.3 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten**

Die DNA-Fragmente wurden in 1,5%igen Agarosegelen aufgetrennt und nach der Färbung in Ethidiumbromidlösung unter UV-Beleuchtung ausgeschnitten. Die eigentliche Gelextraktion

wurde mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit der Firma Qiagen nach dem beiliegenden Protokoll durchgeführt.

#### **3.3.2.1.4 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung**

Die Konzentration gelöster Nukleinsäuren wurde mittels UV-Absorption in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Für optische Dichten  $< 1$  gilt näherungsweise folgender linearer Zusammenhang: 1 OD<sub>260nm</sub> Einheit = 50µg/ ml dsDNA, Plasmide (40µg/ ml RNA).

#### **3.3.2.1.5 Reverse Transkription**

Für die Reverse Transkription wurden 2µl RNA, 4µl First strand buffer (5x), 2µl DTT (0,1M), 1µl dNTP (10mM), 1µl dN6 random primer, 9µl H<sub>2</sub>O für 5min auf 70°C erhitzt, nach Abkühlung auf ca. 50°C Zugabe von 1µl Superscript II und Inkubation des Reaktionsmix bei 37°C für 1h. Die Inaktivierung der Superscript II erfolgte bei 70°C für 10min. Die Zugabe von 1µl RNase A erfolgte über 30min bei 37°C.

#### **3.3.2.1.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR)**

Zur Amplifizierung eines spezifischen DNA-Fragments wurde die Polymerasekettenreaktion angewendet. Die Reaktion erfolgte üblicherweise in einem Volumen von 50µl. Eingesetzt wurde 1x Taq-Polymerase-Puffer, je 1µg Primer, 1mM dNTPs und 5U Taq-Polymerase. Die Amplifikation der cDNA erfolgte durch 28 repetitive Zyklen: Denaturierung (45s, 94°C), Annealen (30s, 58°C), und Elongation (5min, 72°C).

#### **3.3.2.1.7 Quantitative RT- PCR**

Die Quantifizierung der RNA erfolgte durch das LightCycler II System von Roche Diagnostics. Der Reaktionsansatz zur Quantifizierung der RNA wurde wie folgt zusammengesetzt: 10ng cDNA Template, 2µl LightCycler DNA Master SYBR Green I (10x), 1,5µl MgCl<sub>2</sub> (25mM), je 0,5µl der Primer (20mM), mit H<sub>2</sub>O auf 20µl aufgefüllt. Der Versuchsansatz wurde dabei folgendem Programm im LightCycler II unterzogen:

Denaturierung: 1 Zyklus: 20°C/ s auf 95°C, 30 s

Amplifikation: 40 Zyklen: 20°C/ s auf 95°C, 15 s, 20°C/ s auf 60°C, 5 s, 20°C/ s auf 72°C, 10 s

Analyse der Schmelzkurve: 1 Zyklus: 20°C/ s auf 95°C, 15 s, 20°C/ s auf 65°C, 15 s, 20°C/ s auf 95°C, 15 s, 0,1°C/ s auf 40°C

Als Standard zur Quantifizierung der mRNA Expressionsstärke wurde das Haushaltsgen  $\beta$ -Aktin benutzt. Die Analyse der LightCycler Ergebnisse, das heißt die Quantifizierung der mRNA Expression, erfolgte mit der zugehörigen LightCycler II Software nach Angaben des Herstellers.

### ***3.3.2.2 RNA-Techniken: RNA Isolierung aus Säugerzellen***

Die Isolation von RNA wurde mit dem RNeasy® Mini Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### ***3.3.2.3 Proteinchemische Methoden***

#### **3.3.2.3.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten**

Zur Extraktion von Gesamtprotein wurde das Kulturmedium von konfluent wachsenden Säugerzellen abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen, mit dem Zellschaber abgeschabt und in 1ml PBS. Nach Zentrifugation bei 4000rpm für 5min wurde das Zellpellet in 200µl RIPA Puffer (siehe 3.2.3) lysiert und danach 15 min bei 4°C im Schüttelinkubator geschüttelt. Die in Puffer gelösten Proteine konnten dann durch eine zehnminütige Zentrifugation bei 13000 U/min und 4°C von den nicht-löslichen Zellbestandteilen abgetrennt werden. Das Proteinextrakt wurde in neue Gefäße überführt und bei -20°C gelagert.

#### **3.3.2.3.2 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese**

Durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine nach ihrem Molekulargewicht auf Polyacrylamid Gelen (siehe 3.2.3) aufgetrennt werden, da durch die Anlagerung von SDS-Molekülen deren Tertiär- und Quartärstruktur zerstört wird und die Proteine linear vorliegen. Die Proteinproben wurden jeweils in 1x Roti-Load 10min bei 70°C aufgeköcht und anschließend bei 0,8mA/cm<sup>2</sup> durch SDS-PAGE auf PAA Gelen aufgetrennt.

### **3.3.2.3.3 Western Blot**

Um durch SDS-Page aufgetrennte Proteine durch Antikörper nachzuweisen, wurden diese auf PVDF-Membran geblottet. Hierzu wurden die SDS-PAGE Gele nach dem Gellauf zusammen mit der PVDF-Membran 10min in 1x Western-Blot Puffer getränkt und danach die Proteine mittels elektrophoretischem Transfer (Whatman Biometra, Fastblot B34 Unit, 1h bei 1,5mA/cm<sup>2</sup>) auf die Membran übertragen.

### **3.3.2.3.4 Proteindetektion auf Western-Blots**

Die PVDF-Membranen wurden zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 1-2h bei RT in PBS mit 3% BSA inkubiert und über Nacht bei 4°C mit dem 1. Antikörper in geeigneter Verdünnung (1:3000-1:10000) geschwenkt. Nach dem Waschen (3x 10min mit PBS) wurde die Membran mit einem gegen den konstanten Teil des 1. Antikörpers gerichteten (speziesspezifischen) 2. Antikörper (1:8000), der mit Alkalischer Phosphatase konjugiert war, für 1h bei RT inkubiert. Anschließend wurde nochmals gewaschen (3x 10min mit PBS) und das Substrat für die Alkalische Phosphatase (BCIP/ NBT Substrate Kit) zugegeben und 10 Minuten bis zu 2 Stunden inkubiert bis sich eine Farbreaktion zeigte.

### **3.3.2.3.5 MIA-ELISA**

Der MIA-ELISA wurde zusammen mit der Firma Roche entwickelt, um die Menge des Proteins MIA in Lösungen zu bestimmen. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte über zwei Antikörper: der erste Biotin-konjugierte anti-MIA Antikörper verband MIA mit der Streptavidin-beschichteten Oberfläche. Der zweite Peroxidase-konjugierte anti-MIA Antikörper band an MIA. Im Vergleich zur parallel durchgeführten Standardreihe konnte die anschließende Farbreaktion Aufschluss über die Menge von MIA in der Probe geben.

## **3.3.3 Zellkulturmethoden**

### **3.3.3.1 Kultivierung von eukaryontischen Zellen**

Alle verwendeten Zelllinien wurden in DMEM mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Zur Passage der Zellen wurden diese nach dem Waschen mit PBS für 5min mit 0,05% Trypsin/ 0,02% EDTA bei 37°C inkubiert, in DMEM mit 10% FKS



aufgenommen und 1:5 bis 1:10 verdünnt in neue Zellkulturflaschen verteilt. Ein Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten Tag.

### **3.3.3.2 Herstellung von Sphäroiden**

Für die Generierung von Sphäroiden wurden zuerst die Wells einer 96-Well-Platte mit 100µl/Well einer 1% Agarlösung bestückt. Auf den ausgehärteten Agar wurde dann eine bestimmte Zahl an Zellen in 200µl Medium ausgesäht und für sieben Tage bei 37°C inkubiert. Alle drei Tage wurde das Medium gewechselt. Nach sieben Tagen wurden aus den Sphäroiden Ultradünn-Schnitte hergestellt.

### **3.3.3.3 Transfektion von Zellkulturzellen**

Die Transfektion wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt (Invitrogen: Lipofektamin™). Transfizierte Zellen wurden entweder durch Luciferase-Reportergen-Analysen analysiert, oder zu Gesamtzellprotein (siehe 3.4.3.1) beziehungsweise RNA (siehe 3.4.2) weiterverarbeitet. Durch Western Blot – beziehungsweise durch RT-PCR-Analysen konnte das Plasmid detektiert und die Transfektionseffizienz überprüft werden..

Zur Herstellung von stabil transfizierten Zelllinien wurde der Vektor mittels der Lipofektaminmethode in die Zellen eingebracht und durch Zugabe eines entsprechenden Antibiotikums zum Kulturmedium ein Selektionsdruck aufgebaut. Das Selektionsantibiotikum wurde je nach Resistenzgens des transfizierten Vektors, ausgewählt. Durch das Selektionsmedium konnten nur Zellen, die den gewünschten Vektor aufgenommen hatten überleben.

### **3.3.3.4 Luciferase-Reportergen-Assay**

Regulatorische DNA-Sequenzen lassen sich mit Hilfe von sogenannte Reportergen Analysen untersuchen. Bei den für die Transfektionen verwendeten Plasmide handelte es sich um Luciferase-Vektoren. Um die Aktivität eines Promotors zu untersuchen, wurde ein DNA-Fragment, das den Promotorbereich enthält, vor das Luciferase-Gen des Reporterplasmids PTKFLUC bzw. pGL3-basic (siehe 3.1.1) kloniert. Die Expression des Reportergens verhält sich im eukaryontischen Testsystem proportional zum Aktivierungspotential des klonierten DNA-Fragments. Die Zugabe des Substrats (Luciferin) für das Enzym Luciferase führte zur Chemilumineszenz, welche an einem Luminometer gemessen wurde. Um die unterschiedliche Transfektionseffizienz der einzelnen Versuchsansätze anzugleichen, wurden die Zellen mit

einem Kontrollvektor (pRL-TK, Promega, Heidelberg), der das Renilla Luciferase Gen aus *Renilla reniformis* enthält, kotransfiziert. Die Chemilumineszenz der Renilla Luciferase wurde ebenfalls im Luminometer erfasst.

Zur Durchführung des Luciferase Assays wurde der 'Luciferase Assay' Kit der Firma Promega verwendet.

Hierfür wurden je 200000 Zellen pro Well in 6-Well Platten ausgesät und nach der Lipofectamin Methode (siehe 3.5.3) transfiziert. Zur Ernte wurde das Kulturmedium der transfizierten Zellen abgegossen und die Zellplatte zweimal mit normalem Leitungswasser gespült. Anschließend wurden pro Well der 6- Well Kulturplatte 300µl Lysispuffer zugegeben und die Zellen 20 Minuten bis zu zwei Stunden auf einem Schüttler lysiert. Nach der Lyse wurden je 50µl eines Versuchsansatzes, mit den im Kit bereitgestellten Chemikalien im Luminometer vermessen.

### **3.3.4 Transmissionslektronenmikroskopie**

In Kooperation mit Herrn J. Schröder wurden aus Ultradünn-Schnitten von Sphäroiden der Zellen HMB2 und HMB2-5 elektronen-mikroskopische Aufnahmen generiert und auf Zell-Zell-Adhäsionen untersucht.

### **3.3.5 Lichtmikroskopische Aufnahmen**

Die Aufnahmen der Zellen erfolgten mit einem Zeiss Mikroskop und der K300 Software in 20-facher Vergrößerung.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Vorarbeiten

#### 4.1.1 Zellmodell-Beschreibung

Um die Funktion von MIA auf die Genexpression bezüglich der Melanomentstehung, Progression und Metastasierung genauer untersuchen zu können, wurden in unserem Labor bereits in der Vergangenheit MIA-defiziente Melanomzellen aus MIA-positiven Melanomzellen hergestellt: humane MIA-positive Melanomzellen der Linie HMB2 wurden mittels MIA-antisense cDNA Expressionskonstrukten stabil transfiziert. Die endogene Expression von antisense-MIA cDNA führte in der Zelle zur Bildung von RNA-Doppelsträngen und verhinderte damit die Translation von MIA durch die Ribosomen. Die Menge an MIA Protein im Überstand wurde mit Hilfe eines MIA- ELISAs bestimmt: in den Zellklonen HMB2-5 und HMB2-8 konnte kein MIA Protein im Überstand nachgewiesen werden. Die Melanomzelllinie HMB2 und der mit  $\beta$ -galactosidase-Konstrukten transfizierte Kontrollzellklon HMB2lacZ jedoch wiesen vergleichbare Mengen an MIA Protein im Überstand auf. Abbildung 9 zeigt die Konzentration des Proteins MIA im Überstand MIA-positiver Melanomzellen und MIA-defizienter Zellklone.

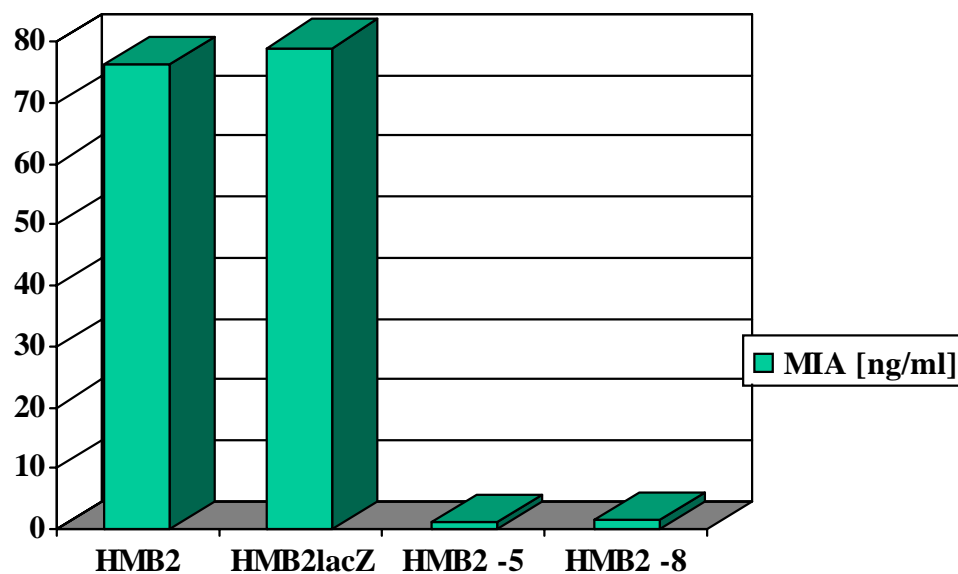


Abbildung 9: Bestimmung der Proteinmenge von MIA mittels ELISA-Technik im Überstand der Melanomzelllinie HMB2, den MIA-defizienten Zellklonen HMB2-5 und HMB2-8 und der Transfektionskontrolle HMB2lacZ.

### **4.1.2 Array und Powerblot**

Die Array-Technologie ermöglicht einen schnellen Vergleich der Genexpression sowie der Proteinexpression verschiedener Zellen und dient der Aufklärung komplexer Genregulationsnetzwerke.

Die RNA Expression MIA-defizienter und MIA-positiver Zellen wurde mit Hilfe des humanen Tumor cDNA Arrays der Firma Clontech verglichen. Dieser Array erlaubt die Untersuchung von 588 Genen. Die Bindung der jeweiligen radioaktiv-markierten cDNA an ihre Bindungspartner auf der Nylonmatrix des Arrays und die daraus resultierende Stärke der radioaktiven Strahlung gaben Auskunft darüber, welche Gene in dem jeweiligen Zelltyp exprimiert wurden. Mit Hilfe des Micro-Arrays (Antikörper-Array) konnte die Proteinexpression der verschiedenen Zellen miteinander verglichen werden. Hierfür wurden die Proteinlysate mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, auf fixierten Antikörpern inkubiert und die Fluoreszenz vermessen. Auch mit der Powerblot-Technik ließen sich eine Vielzahl an Proteinen identifizieren: wie im Western Blot wurden die Proteine nach ihrer Größe und ihrem Gewicht im SDS-Page Gel aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Nach Inkubation der Membran mit bis zu 900 verschiedenen Antikörpern wurden die Expressionsmuster miteinander verglichen. Die ausgewerteten Arrayergebnisse und die Ergebnisse des Powerblots dienten als Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit.

### **4.1.3 Ergebnisse aus Array und Powerblot**

Der cDNA-Array zeigte, dass Gene, die wichtig für die Metastasierung, Progression und Migration von Melanomzellen sind, in den MIA-defizienten Zellklonen HMB2-5 und HMB2-8 nur sehr gering oder gar nicht exprimiert wurden. Hierzu zählten MT1-MMP aus der Familie der Matrix-Metalloproteinasen, tPA (tissue-type plasminogen activator), SPARC (secreted protein, acidic, cystein-rich) und Fibronektin.

Diese Daten konnten mittels RT-PCR bestätigt werden: In den MIA-positiven Melanomzellen HMB2 und der lacZ-Kontrolle war die Expression dieser Gene höher als in den MIA-defizienten Zellklonen HMB2-5 und HMB2-8. Die unterschiedliche Regulation dieser Gene konnte auch auf Proteinebene mit Hilfe der Micro-Array- und Powerblot Methodik nachvollzogen werden. Mit Hilfe dieser Methoden konnten zudem noch weitere Gene detektiert werden, die an der Entwicklung und Progression des Melanoms beteiligt sind und nur in MIA-positiven Zellen vorkommen: L1-Protein und Proteinkinase C alpha wurden in

MIA-defizienten Melanomzellen deutlich geringer exprimiert als in MIA-positiven Zellen. Ein wichtiges Adhäsionsmolekül, „Melanoma-adhesion-protein“ MCAM (Muc18), konnte weder durch Powerblot- noch durch Micro-Array-Analysen in MIA-defizienten Zellen detektiert werden, sondern nur in MIA-positiven Melanomzellen. Auch die tumorassoziierten Adhäsionsmoleküle N-Cadherin und Integrin beta3  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  konnten nur in MIA-positiven Zellen detektiert werden.

	MIA-positive Zellen	MIA-defiziente Zellen
Integrin $\alpha\text{v}\beta\text{3}$	+	-
N-Cadherin	+	-
E-Cadherin	-	+
MT1-MMP	+	-
tPA	+	-
Fibronektin	+	-
SPARC	+	-
MUC18	+	-
L1	+	-

Tabelle 1: Zusammenfassung differentiell exprimierter Gene in MIA-positiven und MIA-defizienten Zellen aus Array und Powerblot.

## ***4.2 Der Einfluss von MIA auf die Adhäsionsmoleküle N- und E-Cadherin***

Einige der Adhäsionsmoleküle, die in den Arrays und dem Powerblot nur in MIA-positiven Zellen exprimiert wurden, wurden in dieser Arbeit weiter untersucht. Zu diesen zählte das Adhäsionsmolekül aus der Familie der Cadherine, das N-Cadherin. N-Cadherin wird nur von MIA-positiven Melanomzellen exprimiert. Die Expression von E-Cadherin hingegen wurde nur in MIA-defizienten Zellen festgestellt. Auf Protein-Ebene (Abbildung 10) sowie auf RNA-Ebene (Daten nicht gezeigt) in der quantitativen RT-PCR konnten diese Daten verifiziert werden.

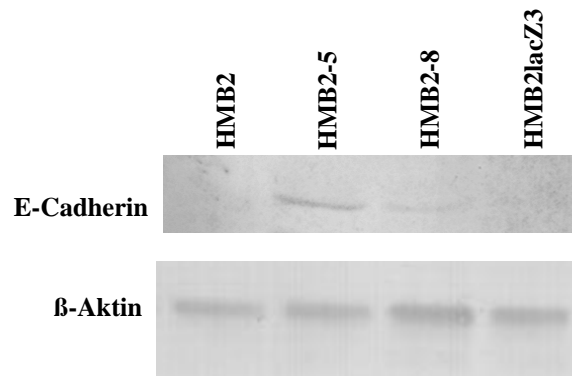


Abbildung 10: Auf Protein-Ebene wird das Adhäsionsmolekül E-Cadherin nur von MIA-defizienten Zellen exprimiert.  $\beta$ -Aktin dient als Ladekontrolle.

Der Wechsel („Switch“) der Cadherin-Expression von E-Cadherin zu N-Cadherin während der Melanomentstehung ist bereits bekannt und geht einher mit einem modifizierten Adhäsionsverhalten der Zellen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass Zell-Zell-Kontakte zwischen MIA-defizienten Zellklonen sowohl im Monolayer- als auch im Sphäroidsystem stärker vorhanden waren als in MIA-positiven Zellen. Im Monolayer bildeten MIA-defiziente Zellklone einen dichten Zellrasen in der Zellkulturflasche. Anders die MIA-positiven Melanomzellen: diese lagerten sich nicht aneinander, sondern verteilten sich weiträumig, Zell-Zellkontakte zwischen den Zellen gab es nicht. In Abbildung 11 ist das Wachstum der Melanomzellen beispielhaft an den ursprünglichen Melanomzellen HMB2 und den MIA-defizienten Zellklonen HMB2-5 gezeigt.

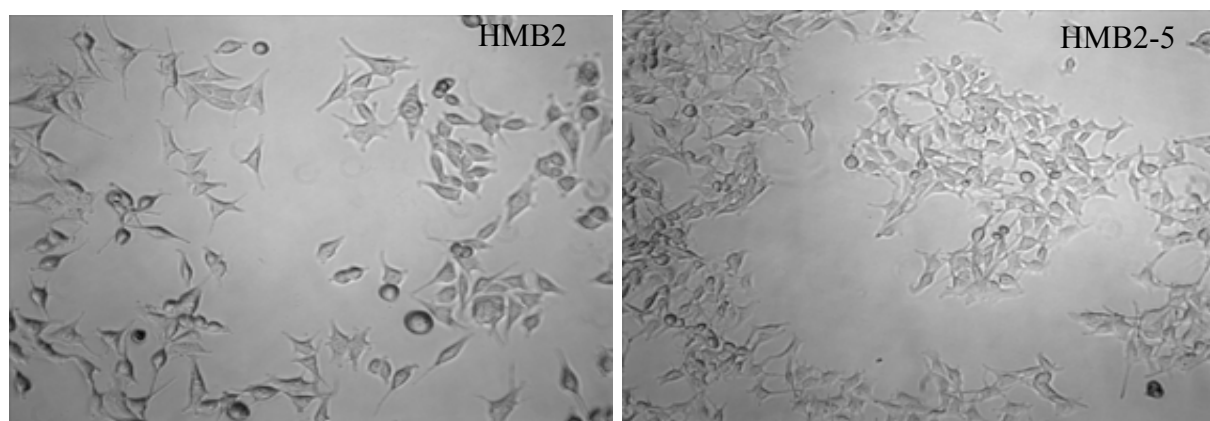


Abbildung 11: Gezeigt ist das unterschiedliche Wachstumsverhalten von MIA-positiven und MIA-defizienten Zellen am Beispiel der Original-Zelllinie HMB2 und dem MIA-defizienten Zellklon HMB2-5. A) HMB2 Zellen liegen verteilt in der Kulturflasche vor. B) HMB2-5 wachsen dicht beieinander und bilden Zellhaufen (Poser et al., 2004).

### ***4.3 Das Tumor-assoziierte Integrin beta3 (ITGB3) wird in MIA-defizienten Zellen nicht mehr exprimiert***

Ein weiteres Molekül, das im cDNA-Array nur von MIA-positiven, nicht jedoch von MIA-defizienten Zellen exprimiert wurde, ist das Adhäsionsmolekül Integrin beta 3 (ITGB3). Von ITGB3 ist bekannt, dass es nur von Melanomzellen, nicht jedoch von Melanozyten exprimiert wird und erst beim Übergang vom „radial-growth-phase“-Melanom (RGP) zum „vertical-growth-phase“-Melanom (VGP) eine wichtige Funktion in der Tumorprogression spielt. Die starke Expression von ITGB3 in MIA-positiven Zellen konnte auf RNA-Ebene mittels quantitativer RT-PCR (Daten nicht gezeigt) sowie auf Protein-Ebene (siehe Abbildung 12) bestätigt werden.

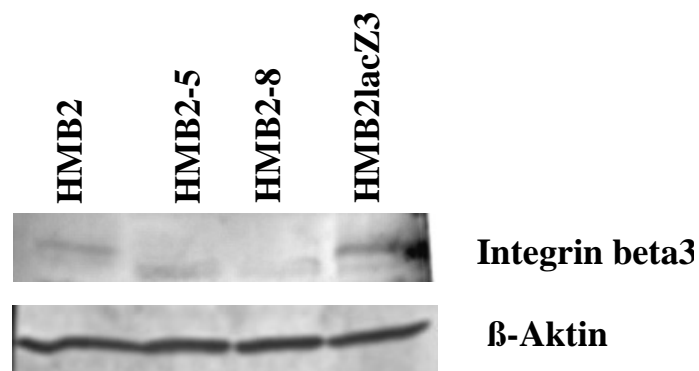


Abbildung 12: Integrin beta3 wird auf Protein-Ebene nur in MIA-positiven, nicht jedoch in MIA-defizienten Zellen exprimiert. β-Aktin dient als Ladekontrolle.

Untersuchungen zur ITGB3 Expression in Melanomen verschiedener Stadien der Tumorprogression zeigten, dass ITGB3 nicht in der normalen Haut, sondern erst in primären Tumoren und in Melanommetastasen exprimiert wird (siehe Abbildung 13). Auch in Gehirn-, Haut-, und Dünndarmmetastasen konnte eine starke Expression von ITGB3 festgestellt werden.

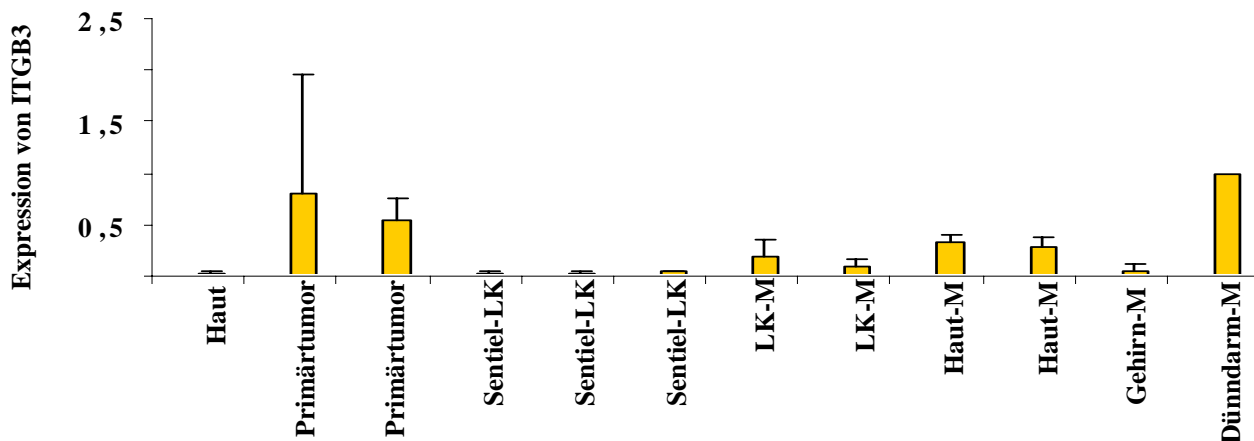


Abbildung 13: Die Expression von Integrin beta3 auf RNA-Ebene ist für verschiedene Stadien der Tumorprogression gezeigt. Integrin beta3 wird nicht in der Normalhaut exprimiert, sondern erst im Primärtumor und in verschiedenen Metastasen. (LK: Lymphknoten, M: Metastase)

#### 4.4 MIA-defiziente Zellen zeigen eine Melanozyten-ähnliche Morphologie.

Der Einfluss der MIA-Expression auf die Zellen zeigte sich auch in der Morphologie der Zellen. MIA-positive Melanomzellen waren sehr viel größer als MIA-defiziente Zellklone. Die unterschiedlichen Größen waren nicht nur in der lichtmikroskopischen Aufnahme deutlich sichtbar (vergleiche Abbildung 11), sondern konnten nach Vermessen auch rechnerisch bestimmt werden (Abbildung 14).

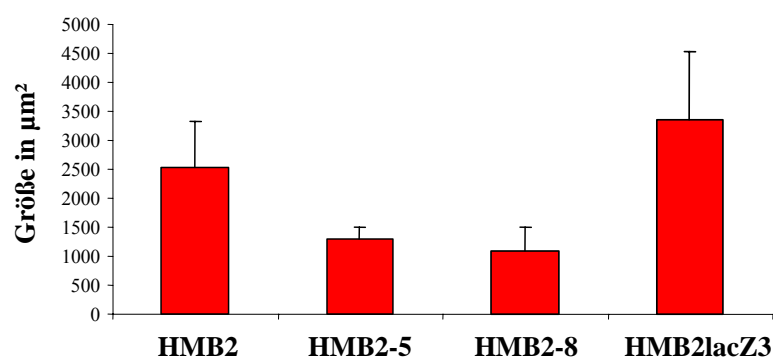


Abbildung 14: Die Vermessung der Zellen zeigt, dass MIA-positive Zellen (HMB2 und HMB2lacZ) deutlich größer sind als MIA-defiziente Zellklone (HMB2-5 und HMB2-8).



Ein weiterer morphologischer Unterschied war auch in der Anzahl der Zellkerne zu sehen.

Melanomzellen wiesen eine Vielzahl an Zellkernen auf. MIA-defiziente Zellklone hingegen besaßen nur einen Zellkern (Daten nicht gezeigt).

MIA-defiziente Zellen ähnelten mit ihren dendritischen Ausläufern ausdifferenzierten Melanozyten. MIA-positive Zellen waren undifferenziert, dendritische Ausläufer fehlten ihnen ganz (Abbildung 15).

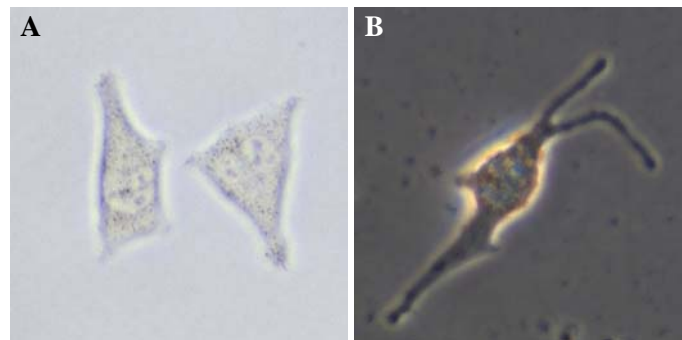


Abbildung 15: A) MIA-positive Zellen sind im Gegensatz zu MIA-defizienten Zellen (B) kaum differenziert und zeigen keine dendritischen Ausläufer.

Auch mit bloßem Auge waren die Unterschiede in MIA-positiven und MIA-defizienten Zellen ersichtlich. Das Zellpellet MIA-defizienter Zellen war bräunlich-schwarz gefärbt, farblos weiß dagegen das MIA-positiver Melanomzellen (siehe Abbildung 16). Bei dem Pigment MIA-defizienter Zellen handelte es sich aufgrund der schwarz-braunen Farbe um Eumelanin: dieses wird in Eumelanosomen synthetisiert und ist wesentlich dunkler als das in Phäomelanosomen synthetisierte Phäomelanin.

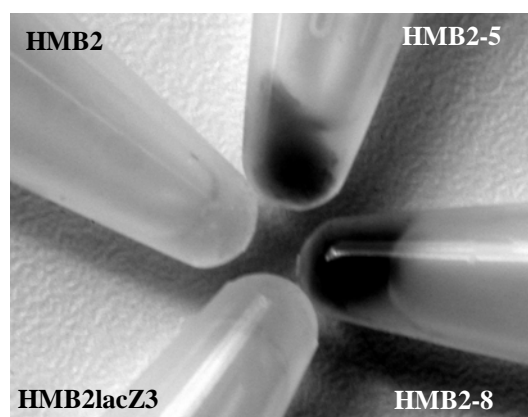


Abbildung 16: Das Zellpellet der MIA-defizienten Zellen ist schwarz gefärbt, das Pellet von MIA-positiven Zellen hingegen ist weiß.

Im Zusammenhang mit der fehlenden Pigmentierung in MIA-positiven Zellen wurden bereits existierende elektronen-mikroskopische Aufnahmen von MIA-positiven und MIA-defizienten Zellen hinsichtlich ihrer Pigmentierungskompartimente, den Melanosomen, untersucht.

In MIA-positiven Zellen konnten nur unreife Melanosomen der Stadien 1 und 2 detektiert werden, MIA-defiziente Zellen hingegen besaßen Melanosomen des 3. und 4. Reifestadiums (Abbildung 17). In den Melanosomen des 3. und 4. Reifestadiums waren deutliche Pigmenteinlagerungen zu sehen. Die rundlich-ovale Form der Pigmentierungskompartimente deutete auf Melanosomen hin, die schwarzes Pigment synthetisieren, so genannte Eumelanosomen. Auch die schwarze Farbe des Pigments (siehe Abbildung 15) unterstützte diese Beobachtung. Zu erkennen waren außerdem lamellen-artige Filamente innerhalb der Melanosomen, die sich längs in den Melanosomen anlagerten. Abbildung 17 zeigt die Verteilung der Melanosomen in MIA-defizienten Zellen. Die Melanosomen lagen verstreut im Zytoplasma vor, sie lagerten sich aber auch an die Zellmembran an.

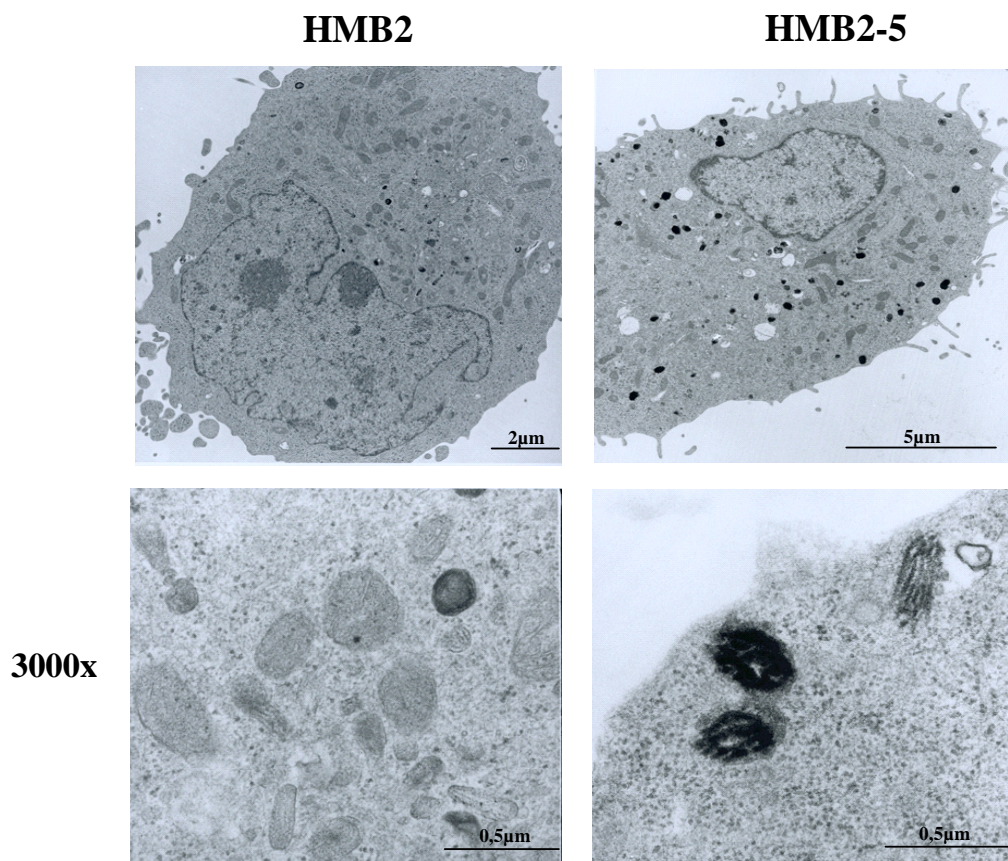


Abbildung 17: In HMB2 Zellen sieht man nur Melanosomen des 1. und 2. Reifestadiums (A und C). In MIA-defizienten Zellen sind reife Melanosomen (Stadium 3 und 4) zu erkennen.

In Tabelle 2 sind die morphologischen Unterschiede wie Größe, Differenzierung und Pigmentierung zusammengefasst:

Morphologische Unterschiede	MIA-positive Zellen	MIA-defiziente Zellen
Größe	groß	klein
Anzahl der Nuklei	multinukleär	mononukleär
Differenzierung	kaum differenziert	stark differenziert
Pigmentierung	farblos /weiss	braun schwarz
Melanosomenstadien	1 und 2	3 und 4

Tabelle 2: Tabelle 2 fasst die morphologischen Eigenschaften MIA-positiver und MIA-negativer Zellen zusammen.

## 4.5 Die Pigmentierungskaskade in MIA-defizienten Zellen

### 4.5.1 Mechanismus der Pigmentierung

Die deutlichen Unterschiede in der Pigmentierung MIA-positiver und MIA-negativer Zellen wurden zum Anlass genommen, die molekularen Ereignisse der Pigmentierungskaskade in den Zellen genauer zu untersuchen. Ein wesentliches Enzym der Pigmentierung, das „tyrosinase-related protein 1“ (Trp-1) zeigte im Powerblot eine starke Expression in den MIA-defizienten Zellen. Trp-1 ist vor allem für die Synthese des Pigments Eumelanin von Bedeutung. Um das Powerblot-Ergebnis zu bestätigen, wurden MIA-positive und MIA-defiziente Zellen auf die Expression von Trp-1 untersucht. Die Expression von trp-1 in MIA-defizienten Zellen konnte auf RNA-Ebene mit der quantitativen RT-PCR verifiziert werden (siehe Abbildung 18).

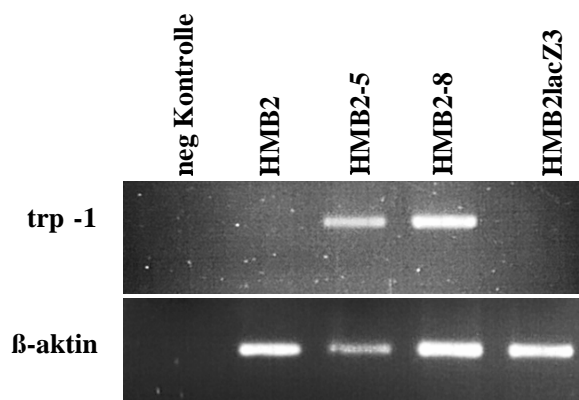


Abbildung 18: trp-1 wird auf RNA-Ebene nur in MIA-defizienten Zellen exprimiert. β-aktin wurde zum Nachweis der Integrität der verwendeten cDNA amplifiziert.

Die Reexpression von Trp-1 im Powerblot in MIA-defizienten Zellen, die Melanosomen der Reifestadien 3 und 4 und die deutlich sichtbare Wiederherstellung der Pigmentierung in diesen Zellen führte zu weiteren molekularen Untersuchungen der Pigmentierungskaskade.

trp-1 wird laut RNA-Daten aus RT-PCR (Abbildung 18) und quantitativer RT-PCR (Daten nicht gezeigt) nur in MIA-defizienten Zellklonen exprimiert, nicht jedoch in MIA-positiven Melanomzellen. Um die Korrelation zwischen MIA und der Expression von pigmentierungsrelevanten Genen zu testen, wurden MIA-defiziente Zellen über verschiedene Zeiträume (24h, 48h, 7 Tage, 2 Wochen) mit exogenem MIA behandelt und die Expression von trp-1 untersucht: eine Reduktion der trp-1-Expression wie in den MIA-positiven Melanomzellen konnte durch die bloße Behandlung mit MIA jedoch nicht erzielt werden. Wurden MIA-defiziente Zellen dagegen mit MIA-Expressionskonstrukten transient transfiziert, MIA in diesen Zellen also wieder exprimiert, zeigte sich, ähnlich wie in Melanomzellen, nach 48h eine verminderte RNA-Expression von trp-1 (HMB2-5+MIA=0,49, HMB2-8+MIA=0,14 jeweils im Vergleich zu unbehandelten HMB2-5=1 und HMB2-8=1). MIA scheint also an der Regulation der Expression von trp-1 beteiligt zu sein und intrazellulär auf die trp-1 Expression zu wirken. Abbildung 19 zeigt die Expression von trp-1 in MIA-defizienten Zellen nach Transfektion mit MIA für 48h.

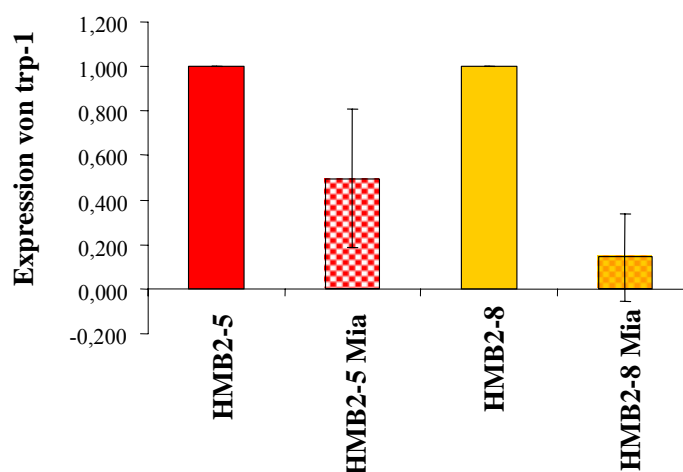


Abbildung 19: Nach Transfektion MIA-defizienter Zellen mit einem MIA-Konstrukt für 48h zeigte sich im Lightcycler auf RNA-Ebene eine verminderte Expression von trp-1.

Trp-1 ist vor allem für die Eumelaninsynthese wichtig ist, stellt aber nur ein Enzym in der Pigmentierungskaskade dar und ist nicht für die Initiierung des Pigmentierungskaskade zuständig. Daher wurden zusätzlich zu Trp-1 weitere Gene und Proteine untersucht, die an der Synthese von Melanin beteiligt sind und die aufgrund der Expression von MIA in den Melanomzellen fehlreguliert sein könnten.

Die Melaninsynthese hängt von bestimmten Enzymen ab, die sich in ihrer katalytischen Aktivität deutlich voneinander unterscheiden (Kobayashi et al., 1994). Zu diesen gehören außer Trp-1, Tyrosinase und die Dopachrome-Tautomerase, (Dct) bekannt auch als Trp-2: die Expression dieser Moleküle ist auf Pigmentzellen beschränkt. Tyrosinase ist das Schlüsselenzym für die Pigmentierung. Untersuchungen zur Expression von Tyrosinase in unserem Zellsystem zeigten, dass Tyrosinase nur von MIA-defizienten Zellklonen exprimiert wird. Weder auf RNA-Ebene (Abbildung 20) in der RT-PCR noch auf Proteinebene im Western Blot (Abbildung 21) konnte eine Tyrosinaseexpression in MIA-positiven Zellen festgestellt werden

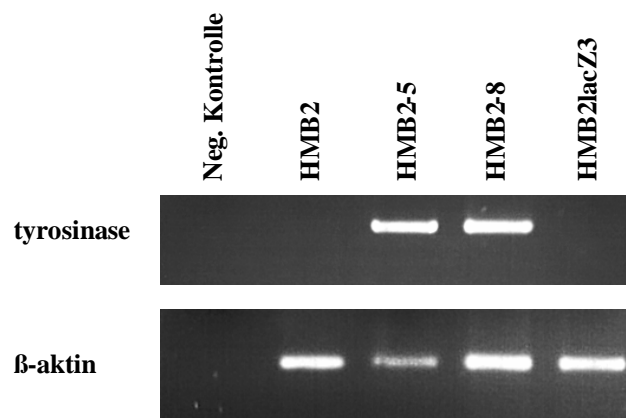


Abbildung 20: Tyrosinase wird in der RT-PCR nur in MIA-defizienten Zellen (HMB2-5/2-8) nachgewiesen, nicht jedoch in MIA-positiven Zellen (HMB2/lacZ3).

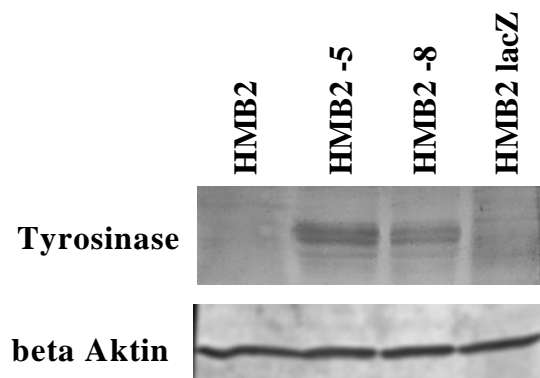


Abbildung 21: Auch mit Hilfe der Western Blot Technik kann Tyrosinase nur in MIA-defizienten Zellen nachgewiesen werden. β-Aktin dient als Kontrolle für die gleichmäßige Ladung .

### 4.5.2 Die Regulation der Pigmentierung in MIA-defizienten Zellen

Aufgrund der reprimierten Expression der pigmentierungs-relevanten Gene *trp-1* und Tyrosinase wurde nach Regulatoren gesucht, die für die Induktion der Expression dieser zwei Gene verantwortlich sein könnten. Reguliert werden die Gene der Tyrosinase-Familie über konservierte Strukturen im Promotorbereich, die so genannte E- und M-Box, sowie im Promoter von *Trp-1* über die regulatorischen Elemente MSEu und MSEi. In Abbildung 22 ist die Promotorregion von *Trp-1* dargestellt.

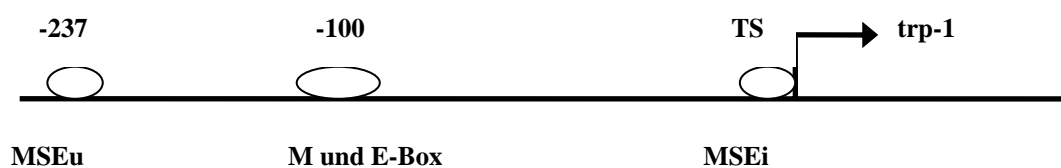


Abbildung 22: Schematische Darstellung des *Trp-1* Promotors mit den regulatorischen Elementen MSEu und MSEi sowie der Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor MITF, die M- und die E-Box. TS: Transkriptionsstart.

An die E- und die M-Box im Promotorbereich von Tyrosinase und *Trp-1* bindet der Transkriptionsfaktor aus der Familie der bHLH Faktoren MITF, „Microphthalmia associated transcription factor“, und initiiert dort die Transkription der pigmentierungs-relevanten Gene. An die Elemente MSEu und MSEi im Promotorbereich von *Trp-1* binden die Transkriptionsfaktoren Tbx-2 und PAX3. Die Erkennungssequenzen der regulatorischen Elemente sind in Tabelle 3 aufgeführt

Promotorelemente	Erkennungssequenz
M-Box	CATGTG
E-Box	CANNTG
MSEi	GTGTGA
MSEu	GTGTGA

Tabelle 3: Gezeigt werden die Erkennungssequenzen der regulatorischen Elemente des *Trp-1* Promotors.

#### 4.5.2.1 Die Expression von MITF:

Um zu prüfen, in wie weit positive oder auch negative Regulatoren in unserem Zellsystem an der Induktion der Transkription von Trp-1 und Tyrosinase beteiligt sind, wurde die Expression dieser Faktoren untersucht. Zuerst wurde die Rolle von MIA in der Regulation von MITF hinterfragt und die Expression von MITF in MIA-defizienten und MIA-positiven Zellen auf RNA- wie auch auf Protein-Ebene untersucht. Auf RNA-Ebene konnten keine Unterschiede in den Zellen in der MITF-Expression festgestellt werden (Abbildung 23), auf Proteinebene allerdings wurde MITF in MIA-defizienten Zellen exprimiert, in MIA-positiven Zellen fehlte die MITF-Expression (Abbildung 24).

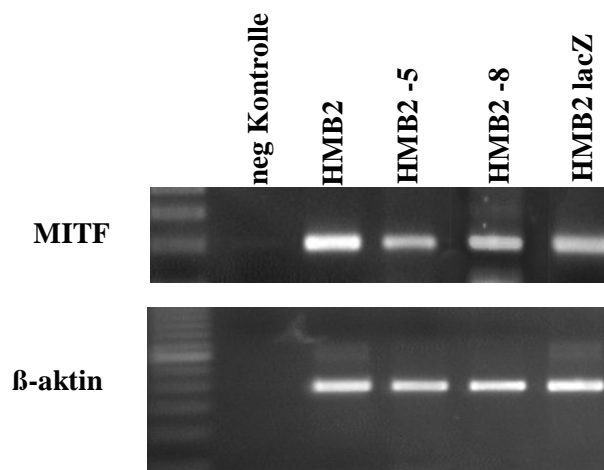


Abbildung 23: Auf RNA-Ebene in der RT-PCR sind keine Unterschiede in der Expression von MITF festzustellen. β-aktin dient als Qualitätskontrolle der verwendeten cDNA.

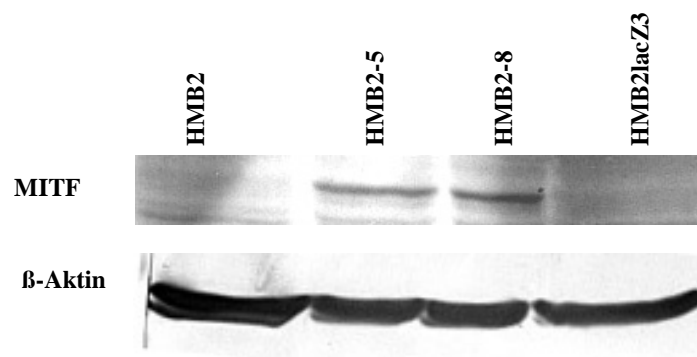


Abbildung 24: Auf Protein-Ebene wird MITF stark in MIA-defizienten Zellen exprimiert, nicht jedoch in MIA-positiven Zellen. β-Aktin dient der Kontrolle für die gleichmäßige Proteinbeladung des Blots.

#### 4.5.2.2 Die Regulation von MITF in MIA-positiven Zellen

Aufgrund der fehlenden Proteinexpression von MITF in Melanomzellen wurde nach Faktoren und Signalwegen gesucht, die MITF auf Proteinebene regulieren. Auf Protein-Ebene wird der Transkriptionsfaktor MITF über den MAP-Kinase-Signalweg und den Faktor „protein-inhibitor of activated STAT3“, PIAS3, reguliert (Levy et al., 2003).

##### 4.5.2.2.1 Die Regulation von MITF über den MAP-Kinase-Weg

Der MAP-Kinase Weg führt über die Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase Erk-2/Erk-1 und der Serin-/Threoninkinase Rsk90 zur Phosphorylierung von MITF an Serin 73 (Erk-2) und an Serin 409 (Rsk90). Diese Phosphorylierungen führen zunächst zur Aktivierung der transkriptionellen Aktivität von MITF, dann aber zu dessen proteasomalem Abbau (Steingrimsson et al., 2004). Zur Untersuchung der Aktivität des MAP-Kinase Wegs und des möglichen Einflusses der MAP-Kinase Erk-1 beziehungsweise Erk-2 auf die Stabilität und Aktivität von MITF, wurde auf Protein-Ebene durch Western Blot Analyse die Expression und der Phosphorylierungsstatus der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen Erk-1 und Erk-2 getestet. Abbildung 25 zeigt, dass die MAP-Kinase Erk-1 unphosphoryliert in allen Zellen vorliegt, Erk-2 ist jedoch nur in den MIA-positiven Zellen phosphoryliert. Die Aktivierung des MAP-Kinase-Wegs und der damit verbundenen Phosphorylierung von Erk-2 kann also einen direkten Einfluss auf MITF nehmen. Die Reduktion der MITF Proteinmenge in MIA-positiven Zellen könnte also durch eine erhöhte Aktivität von Erk-2 hervorgerufen werden.

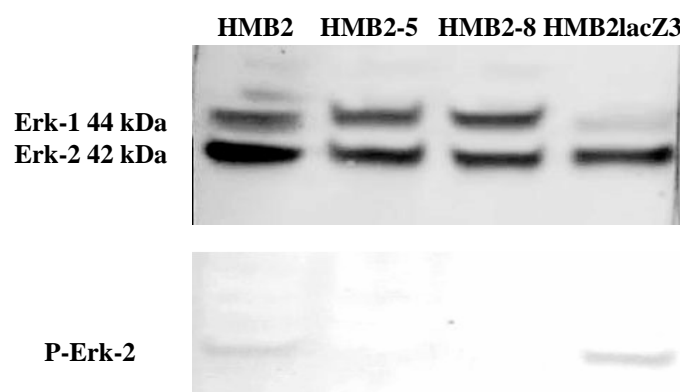


Abbildung 25: Die MAP-Kinase Erk-2 liegt phosphoryliert in MIA-positiven, nicht jedoch in MIA-negativen Zellen vor. Die gleichmäßige Beladung des Blots kann anhand der Erk-2 Expression abgeschätzt werden.



Um diese Theorie zu überprüfen, wurden MIA-positive Zellen mit dem Inhibitor des MAP-Kinase-Wegs PD98059 behandelt. PD98059 inhibiert die Aktivierung der MAP-Kinase-Kinase MEK und verhindert so die Aktivierung von Erk-1 und Erk-2 und den nachfolgenden Zielgenen. Durch den Inhibitor PD98059 wird der MAP-Kinase-Weg also inhibiert und MITF stabilisiert (Kim et al., 2002). Falls allein der MAP-Kinase-Weg für den proteasomalen Abbau und der damit verbundenen fehlenden transkriptionellen Aktivität von MITF verantwortlich ist, müsste durch Zugabe des Inhibitors wieder aktives MITF vorliegen. Die Expression von trp-1 und tyrosinase könnte dann durch MITF wieder induziert werden und die Transkripte müssten auf RNA-Ebene detektierbar sein. MIA-positive Zellen wurden über verschiedene Zeiträume (24h und 48h) mit dem Inhibitor behandelt und dann auf RNA-Ebene auf die Expression von Trp-1 und Tyrosinase getestet. Doch trotz der Inhibierung des MAP-Kinase-Wegs konnte die Expression von trp-1 oder tyrosinase nicht induziert werden. Dieses Ergebnis deutet auf die Anwesenheit weiterer Regulatoren von MITF oder auch auf Faktoren hin, die an der Regulation der pigmentierungs-relevanten Gene tyrosinase und trp-1 beteiligt sind. In Abbildung 26 ist die Regulation von MITF über den MAP-Kinase-Weg schematisch dargestellt. Weiter ist aufgezeigt, wie der Inhibitor PD98059 auf die MAP-Kinase Erk wirkt.

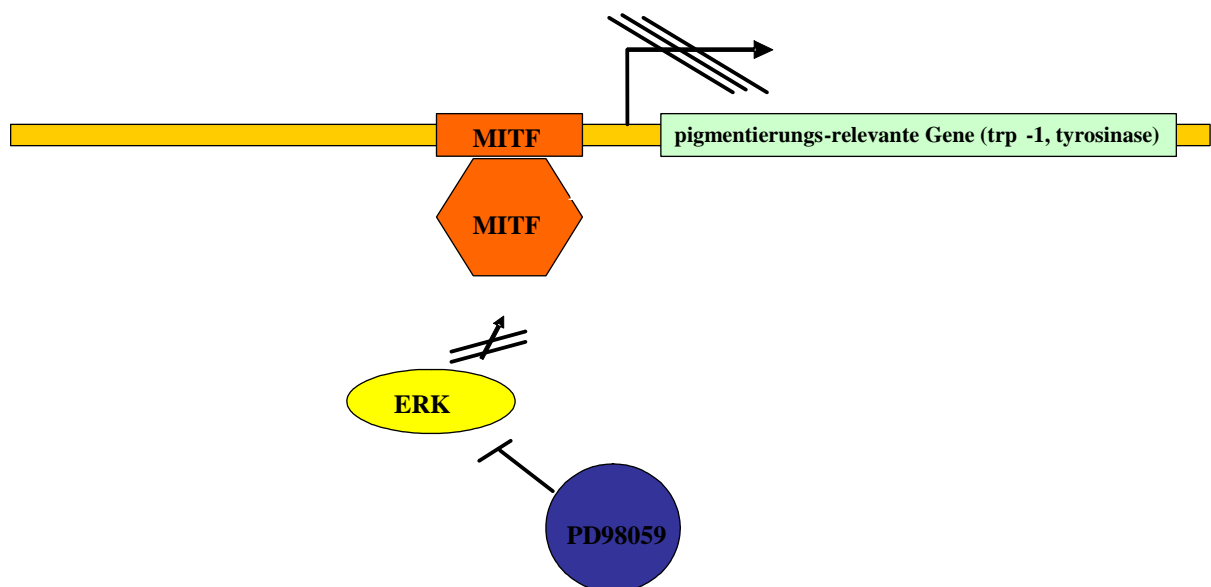


Abbildung 26: Die Stabilität von MITF wird über den MAP-Kinase-Weg reguliert. Doch trotz der Inhibierung des MAP-Kinase-Wegs durch den Inhibitor PD98059 und der damit einhergehenden Stabilisierung von MITF wird die Transkription der pigmentierungs-relevanten Gene in den Melanomzellen HMB2 und HMB2lacZ3 nicht induziert.

#### 4.5.2.2.2 PIAS3 als destabilisierender Faktor von MITF

Ein negativer Regulator der MITF-Aktivität ist PIAS3. PIAS3, „Protein-inhibitor of activated STAT3“, bindet an die Leucin-Zipper-Domäne von MITF, verhindert die Bindung von MITF an die DNA und inhibiert so dessen transkriptionelle Aktivität. PIAS3 kann durch die Bindung an MITF also die Transkription beispielsweise von Trp-1 oder Tyrosinase verhindern. Auch besitzt PIAS3 eine Sumoligase-Aktivität. In dieser Funktion kann PIAS3 die Stabilität und Funktion von Proteinen beeinflussen. Um zu testen, ob PIAS3 in unserem Zellsystem eine Rolle für die Stabilität von MITF spielt, wurde zunächst die Expression von PIAS3 in unserem Zellsystem getestet. Auf RNA-Ebene konnte PIAS3 nur in MIA-positiven Zellen detektiert werden (Abbildung 27).

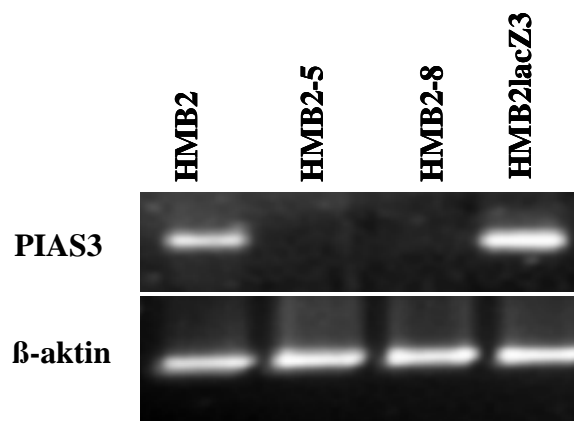


Abbildung 27: Auf RNA-Ebene wird PIAS3 nur in MIA-positiven Zellen exprimiert.  $\beta$ -aktin dient der Qualitätskontrolle der verwendeten cDNA.

Um die Inhibierung der transkriptionellen Aktivität beziehungsweise um die Destabilisierung von MITF durch PIAS3 aufzuheben, wurden Zellklone generiert, die kein funktionelles PIAS3 synthetisieren. Dies wurde mittels stabiler antisense-PIAS3 cDNA Transfektion in die MIA-positiven HMB2 Zellen erreicht: die Expression von antisense-PIAS3 RNA führte in der Zelle zur Bildung von RNA-Doppelsträngen und verhinderte damit die Translation durch die Ribosomen. Die Expression von PIAS3 konnte durch diese Transfektion nachweislich in den MIA-positiven Zellen verhindert und MITF dadurch stabilisiert werden (Abbildung 28).

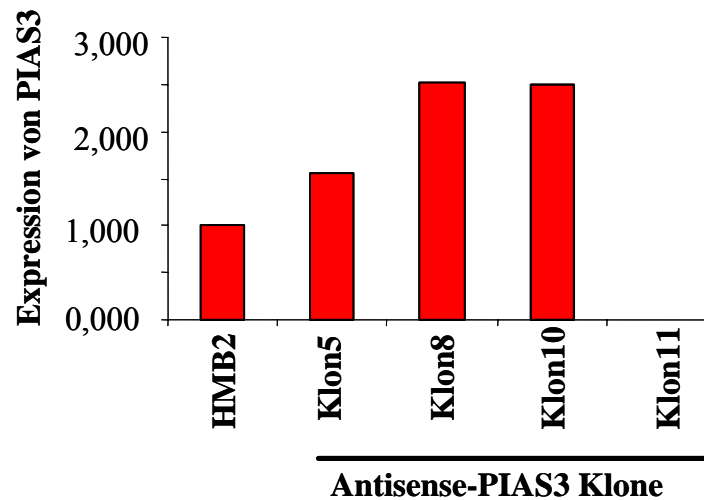


Abbildung 28: Gezeigt ist die PIAS3-Expression in antisense-PIAS3 Klonen in einer RT-PCR. Antisense-PIAS3 Klonen wurden auf RNA-Ebene auf ihre Expression von PIAS3 getestet. Im Vergleich zur Positivkontrolle HMB2 zeigt Klon 11 keine PIAS3 Expression. Dieser Klon wurde für die weiteren Experimente gewählt.

Die Zellen wurden dann auf die Expression von *trp-1* beziehungsweise tyrosinase getestet. Eine Expression von *trp-1* oder tyrosinase konnte allerdings trotz Inhibierung von funktionellem PIAS3 in den Melanomzellen nicht induziert werden. Um sicher zu stellen, dass in den MIA-positiven Zellen ausreichend MITF zur Induktion der *trp-1* Expression vorhanden war, wurde MITF Protein in den antisense-PIAS3 Klonen durch Zugabe des MAP-Kinase-Inhibitors PD98059 stabilisiert. Doch trotz dieser Behandlung konnte keine *Trp-1*-beziehungsweise Tyrosinase-Expression in den MIA-positiven Zellen detektiert werden (siehe Abbildung 29).

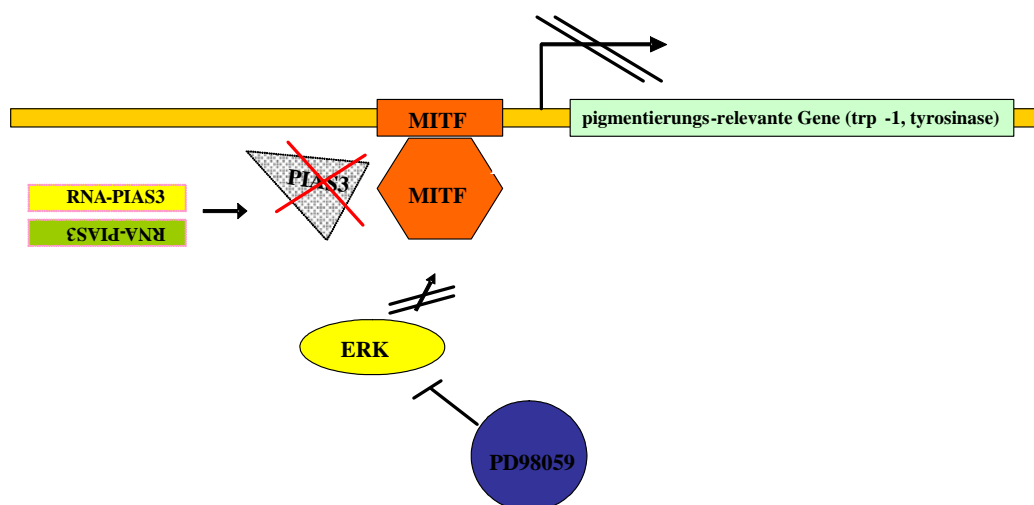


Abbildung 29: Trotz Inhibierung des destabilisierenden Faktors PIAS3 und der Inaktivierung des MAP-Kinase-Wegs kann MITF die Transkription von *trp-1* und tyrosinase nicht induzieren.

#### 4.5.2.3 Die Regulation des *Trp-1* Promotors in MIA-defizienten Zellen

#### 4.5.2.4 PAX3 induziert die Transkription von *trp-1*

Da MITF alleine für eine Induktion der Transkription von *Trp-1* und Tyrosinase nicht ausreichte, wurde nach weiteren Transkriptionsfaktoren von *Trp-1* und Tyrosinase gesucht, die die Expression der pigmentierungs-relevanten Gene induzieren.

Ein Regulator des pigmentierungs-spezifischen Gens *Trp-1* ist der Transkriptionsfaktor PAX3. PAX3 bindet und aktiviert den Promotorbereich von *Trp-1* und führt so zur Transkription von *Trp-1*. Um zu sehen, ob ein Verlust von PAX3 in MIA-positiven Zellen vorliegt, wurde die Expression von PAX3 mittels quantitativer RT-PCR in unserem Zellsystem untersucht. Nur in MIA-defizienten Zellen konnte PAX3 auf RNA-Ebene nachgewiesen werden (HMB2-5=1, HMB2-8=0,47), in MIA-positiven HMB2 und HMB2lacZ3 Zellen jedoch konnte keine PAX3 Expression detektiert werden (HMB2=0,001, HMB2lacZ3=0,002). Abbildung 30 zeigt die Expression von PAX3 in MIA-positiven und MIA-defizienten Zellen auf RNA-Ebene.

Der Verlust von PAX3 in den MIA-positiven Zellen würde die fehlende Expression von *Trp-1* begründen. Daher wurden MIA-positive Zellen über 24h und 48h mit einem PAX3-Konstrukt transient transfiziert und die Expression von *Trp-1* in der RT-PCR getestet. Allerdings führte die induzierte Expression von PAX3 in MIA-positiven Zellen nicht zu einer Reexpression von *Trp-1* (Daten nicht gezeigt).

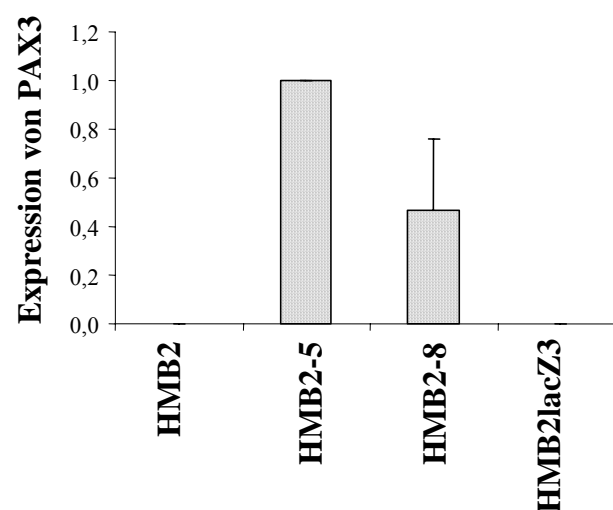


Abbildung 30: Die quantitative RT-PCR zeigt die Expression von PAX3 auf RNA-Ebene in den MIA-defizienten Zellklonen HMB2-5 und HMB2-8.

#### 4.5.2.5 Die Regulation des *Trp-1* Promotors durch *Tbx-2*

Da durch Überexpression beziehungsweise Stabilisierung von MITF und PAX3 die Expression von *Trp-1* und Tyrosinase nicht induziert werden konnte, wurden negative Regulatoren des *Trp-1*-Promotors untersucht. Der Promotorbereich von *Trp-1* besitzt verschiedene regulatorische Sequenzen (siehe Abbildung 22). MSEu und MSEi werden sowohl von PAX3 als auch von dem brachyury-related transcription factor, *Tbx-2*, erkannt und gebunden. *Tbx-2* fungiert als Repressor der Transkription von *Trp-1*. Die Expression von *Tbx-2* in MIA-positiven Zellen würde also die fehlende Expression von *Trp-1* begründen. Auf RNA-Ebene wurde die Expression von *Tbx-2* untersucht. Exprimiert wurde *Tbx-2* in den MIA-positiven Zellen (HMB2=1, HMB2lacZ3=1,4), eine reduzierte Expression zeigte sich in MIA-defizienten Zellen (HMB2-5=0,28, HMB2-8=0,442), was eine mögliche Funktion von *Tbx-2* als aktivem Repressor der *Trp-1* Expression in MIA-positiven Zellen unterstreicht. Abbildung 31 zeigt die Expression von *Tbx-2* auf RNA-Ebene in MIA-positiven und MIA-negativen Zellen.

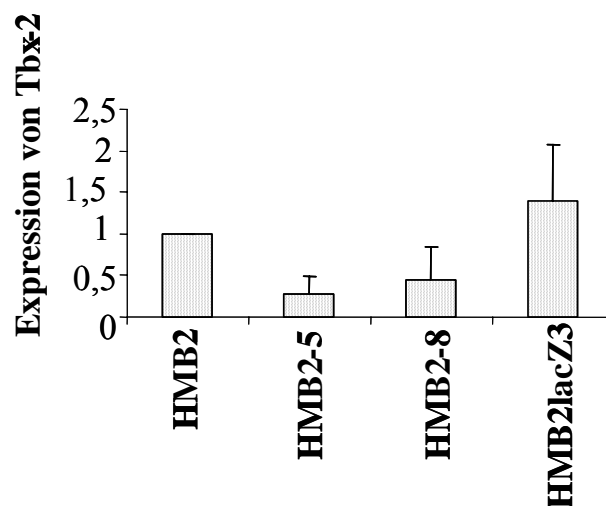


Abbildung 31: Expression von *Tbx-2* auf RNA-Ebene: *Tbx-2* wird verstärkt in MIA-positiven Melanomzellen exprimiert, in MIA-defizienten Zellen ist die Expression von *Tbx-2* vermindert.

#### 4.6 *Brn-2 wird auf Proteinebene nur von MIA-positiven Zellen exprimiert.*

Brn-2 ist an der Neuronalentwicklung, am Wachstum und dem Überleben von Melanomzellen beteiligt. Um zu testen, ob MIA vielleicht an der Regulation von Brn-2 beteiligt ist und so zum Überleben der Melanomzellen beiträgt, wurde die Expression von Brn-2 in MIA-positiven und MIA-defizienten Zellen getestet. Auf RNA-Ebene (Abbildung 32) zeigte sich eine verminderte Expression von brn-2 in den MIA-defizienten Zellen HMB2-5 und HMB2-8 im Vergleich zu den Melanomzellen HMB2 (HMB2=1, HMB2-5=0,09, HMB2-8=0,2, HMB2-lacZ3=2,04). Auf Proteinebene wurde Brn-2 nur in MIA-positiven Zellen exprimiert, nicht jedoch in MIA-defizienten Zellen. Abbildung 33 zeigt die Expression von Brn-2 in MIA-positiven und MIA-defizienten Zellen auf Protein-Ebene im Western Blot. Die Expression von Brn-2 in MIA-positiven Zellen auf Protein-Ebene und auf RNA-Ebene deutet darauf hin, dass die Brn-2 Expression durch die Expression von MIA beeinflusst wird.

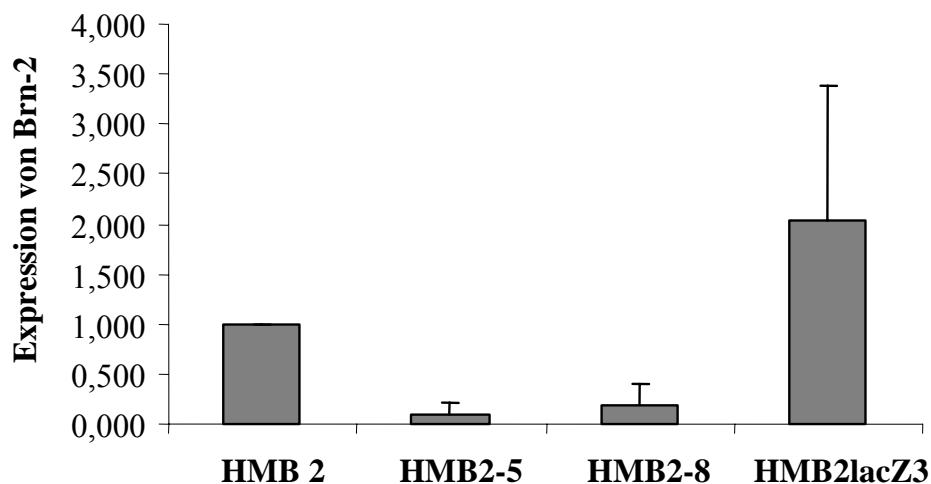


Abbildung 32: Auf RNA-Ebene konnten aufgrund der großen Standardabweichungen keine Unterschiede in der Brn-2 Expression von MIA-positiven und MIA-negativen Zellen festgestellt werden.

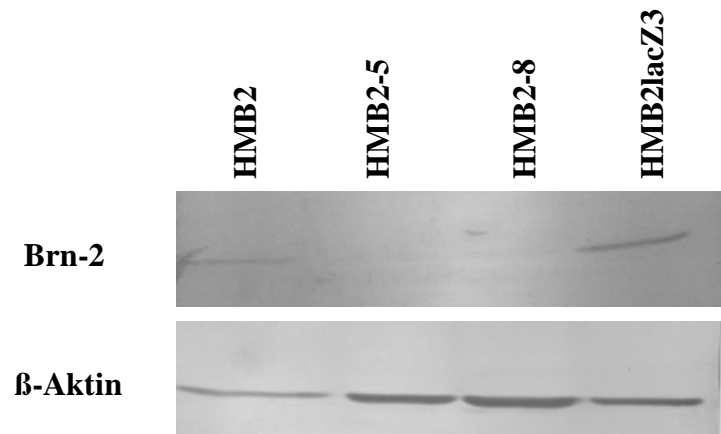


Abbildung 33: Brn-2 wird auf Protein-Ebene im Western Blot nur von MIA-positiven Zellen exprimiert, nicht jedoch von MIA-defizienten Zellen.

#### 4.7 MIA als Regulator der Chromatinstruktur?

Die DNA kann durch verschiedene Modifikationen in ihrer Struktur verändert werden. Die meisten Veränderungen wie Acetylierung, Phosphorylierung und Methylierung betreffen die Histonproteine. Die DNA windet sich um diese herum und ist, je nach Modifikation, mehr oder weniger für Transkriptionsfaktoren, regulatorische Komplexe und RNA-Polymerasen zugänglich. Eine mögliche Modifikation von Histonen ist die Acetylierung und die Deacetylierung. Acetylierte Histone bewirken eine Dekondensation des Chromatins und tragen so zur Transkription der Gene bei. Werden die Histone deacetyliert, kommt es zur Kondensation der DNA, regulatorische Sequenzen sind schwer zugänglich und die Transkription von Genen unterbleibt.

Um zu testen, ob MIA an der Regulation der Histondeacetylierung beteiligt ist und über diesen Mechanismus einen Einfluss auf die Genexpression nimmt, wurden die Melanomzellen HMB2 über verschiedene Zeiträume mit dem Histondeacetylase-Inhibitor Trichostatin A (TSA) behandelt. Falls MIA einen positiven regulatorischen Einfluss auf die Deacetylasen nimmt, müsste dieser durch die Zugabe des Inhibitors aufgehoben und die Transkription von Genen induziert werden. Die Expression von *trp-1* und *tyrosinase* wurde nach der Behandlung mit TSA in der PCR getestet. Die Behandlung der Melanomzellen mit TSA führte nicht zur Reexpression der Gene *trp-1* und *tyrosinase*. Die Morphologie der behandelten Melanomzellen unterschied sich jedoch deutlich von der unbehandelten Melanomzellen. Die mit TSA behandelten Zellen zeigten eine eher melanozytäre, differenzierte Morphologie mit langen,

dendritischen Ausläufern. Morphologisch undifferenziert zeigten sich die unbehandelten Melanomzellen (Abbildung 34). Die Wirkung von TSA auf die Morphologie von Zellen zeigte sich auch in der Morphologie der in dieser Arbeit verwendeten Melanomzellen. Allerdings hatte TSA keinen Einfluss auf Gene, die für die Differenzierung des melanozytären Typs wichtig sind.

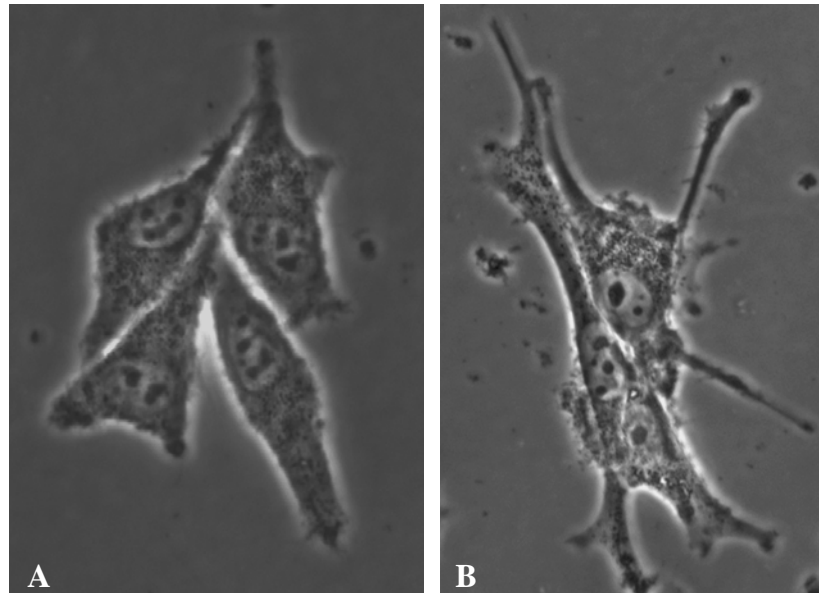


Abbildung 34: A) Unbehandelte Melanomzellen HMB2 als Kontrolle. B) Melanomzellen HMB2 mit TSA behandelt für 48h (20xVergrößerung).

#### ***4.8 Kurze Übersicht der Ergebnisse***

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit noch einmal kurz zusammengefasst. In dieser Studie konnten wir zeigen, dass das Protein MIA in Melanomzellen in die Regulierung verschiedener Signalwege und Transkriptionsfaktoren eingreift. Auffallend waren auch die morphologischen Unterschiede zwischen MIA-positiven und MIA-defizienten Zellen hinsichtlich ihrer Größe, Ausdifferenzierung und Pigmentierung. Vor allem für die Prozesse der Pigmentierung scheint MIA von erheblicher Bedeutung zu sein: die Expression pigmentierungs-relevanter Gene fehlt in MIA-positiven Zellen vollständig, während die Expression von Faktoren, die die Pigmentierung negativ regulieren, klar erhöht ist.



## 5 Diskussion

Das Protein MIA „Melanoma Inhibitory Activity“ wird ausschließlich von malignen Melanomzellen, nicht jedoch von Melanozyten synthetisiert und sezerniert und ist von wesentlicher Bedeutung für die Invasivität und Metastasierung des malignen Melanoms (Bossert et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, in wie weit MIA auch an der Entstehung von malignen Melanomen beteiligt ist und welche Signalwege diesbezüglich von MIA beeinflusst werden. Dazu wurde bereits in früheren Arbeiten die MIA-Expression in MIA-positiven Melanomzellen mittels stabiler antisense-MIA-cDNA-Transfektion ausgeschaltet. In der vorliegenden Arbeit wurden die Morphologie und Unterschiede auf molekularer Ebene zwischen MIA-positiven und MIA-defizienten Zellen untersucht und verglichen. Ausgehend von bereits existierenden Array- und Powerblot-Daten wurden unterschiedlich exprimierte Gene und Proteine ermittelt, die für diese Dissertation von besonderem Interesse waren. Die Bestätigung dieser unterschiedlich exprimierten Gene und Proteine erfolgte auf RNA- und Protein-Ebene. Ferner wurde untersucht, wie MIA die differentielle Genexpression regulieren kann, auf welcher Ebene MIA in die Genexpression eingreift und auf welche Tumor-relevanten Signalwege MIA Einfluss nimmt.

### ***5.1 Die fehlende Expression Tumor-relevanter Gene in MIA-defizienten Zellen***

Moleküle, die bekanntermaßen verstärkt in Melanomen exprimiert werden, werden in MIA-defizienten Zellen reprimiert. Zu diesen gehören Adhäsionsmoleküle aus der Familie der Cadherine und der Integrine, zum Beispiel N-Cadherin und Integrin beta3 (Abbildung 11).

#### **5.1.1 Melanomzellen durchlaufen eine epitheliale-mesenchymale Transition (EMT).**

Der Verlust der Zell-Zell-Adhäsion von Tumorzellen gehört zu den Schlüsselereignissen der Tumorprogression. Die Adhäsionsmoleküle aus der Cadherin-Familie vermitteln Kalzium-abhängige homophile Zell-Zelladhäsion (siehe auch 2.1.5.2.2). Während der Embryonalentwicklung sind vor allem E- und N-Cadherin an der Regulation diverser morphogenetischer Ereignisse, wie zum Beispiel der Trennung der Neuralleistenzellen aus dem Neuralrohr (siehe unten), beteiligt (De Luca et al., 1988). In der Haut ist die Expression

von E-Cadherin auf Melanozyten wie auch auf Keratinozyten für die Kommunikation zwischen diesen beiden Zelltypen notwendig: Durch diese Kontakte regulieren Keratinozyten die Proliferation der Melanozyten und erhalten so ein spezifisches Keratinozyten-Melanozyten-Verhältniss (De Luca et al., 1988). Keratinozyten kontrollieren über homophile Cadherin Adhäsion zudem die Morphologie der Melanozyten (De Luca et al., 1988) und durch die Synthese und Sekretion von  $\alpha$ -MSH die Synthese von Melanin in den Melanozyten (Jimbow, 1995).

Ein grundlegender Cadherin-abhängiger Prozess, der während der Entwicklung an der Bildung vieler Zelltypen, wie zum Beispiel der Bildung der Melanozyten-Vorläufer aus den Zellen der Neuralleiste beteiligt ist, ist die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) (Thiery, 2003). Die EMT bewirkt die Bildung mesenchymaler Zellen aus epitheliale Gewebe. Dieser Prozess ist gekennzeichnet durch Modifikationen in der Zell-Zell-Adhäsion von auswandernden Zellen, sowie dem Erwerb mesenchymaler und migratorischer Eigenschaften (Thiery, 2002).

Die Modifikationen in der Zell-Zelladhäsion sind auf Veränderungen von Adhäsionskomplexen (Desmosomen) zurückzuführen: diese sind aus E-Cadherin aufgebaut und können durch den Verlust von E-Cadherin nicht mehr gebildet werden (Christofori and Semb, 1999). Die Auflösung der Desmosomenstruktur führt zum Zerfall des Netzwerks aus Intermediärfilamenten in der Zelle: die Zellen sind nicht mehr in das Epithel eingegliedert und können sich herauslösen (Thiery, 2002). Ein weiteres Merkmal der EMT ist außerdem die Umverteilung der Organellen in der Zelle (Thiery, 2003).

Untersuchungen in der Maus haben gezeigt, dass der Verlust der E-Cadherin Expression mit einer Induktion der N-Cadherin Expression einher geht (Nakagawa and Takeichi, 1995). Die Expression von N-Cadherin trägt wahrscheinlich dazu bei, die Zellen aus dem Epithel zu lösen und die Migration der Zellen durch die Adhäsion an Fibroblasten zu fördern (Peinado et al., 2004).

Der Expressionsverlust des Tumor-Suppressor-Proteins E-Cadherin, gepaart mit der Induktion von N-Cadherin vollzieht sich allerdings nicht nur während der normalen Entwicklung, sondern auch während der Tumorentstehung und kann während der Tumorprogression vieler Karzinome beobachtet werden (Birchmeier and Behrens, 1994). Die Expression von N-Cadherin wird mit einem anwachsenden Invasionspotential von Tumoren in Zusammenhang gebracht: Der Cadherin-Wechsel in den Melanomzellen scheint also, wie in der klassischen EMT, die Adhäsionseigenschaften der Zellen zu ändern. Die Melanomzellen können transiente Zell-Zellkontakte zu umgebenden Fibroblasten und zum

Stroma eingehen, was ihr Migrationspotential erhöht (Peinado et al., 2004). Die zunehmende Expression der Matrix-Metalloproteinase MMP9 und die Aktivierung des MAP-Kinase-Wegs nach Expression von N-Cadherin in Brustkrebszellen könnte zudem für die ansteigende Invasivität der Tumorzellen verantwortlich sein (Suyama et al., 2002).

Warum genau es zum Verlust von E-Cadherin und zur Expression von N-Cadherin während der Tumorentstehung kommt, ist noch nicht hinreichend geklärt. Untersuchungen zu Regulatoren der EMT während der Entwicklung konnten zeigen, dass die für die Induktion der EMT wichtigen Gene gleichzeitig die Repression von E-Cadherin bewirken. Einer dieser Regulatoren ist das Zink-Finger-Protein Snail (Nieto, 2002). Snail ist ein DNA-bindender Faktor, der an das E-Box-Motiv von Zielpromotoren bindet (Nieto, 2002). In *Drosophila* wird Snail exprimiert bevor die Zellen die EMT durchlaufen und verhindert die Expression von E-Cadherin. In Mäusen und humanen invasiven Karzinomzellen induziert Snail den Vorgang der EMT (Nieto, 2002). Auch in Melanomzellen wird der Verlust von E-Cadherin mit der Expression von Snail in Verbindung gebracht (Poser et al., 2001). Die Expression von Snail während der EMT wird über den MAP-Kinase-Weg reguliert (Thiery, 2002).

Die Abwesenheit von E-Cadherin und eine verstärkte Expression von N-Cadherin ist auch in den in dieser Arbeit verwendeten Melanomzellen HMB2 zu beobachten. Auch der EMT-induzierende Transkriptionsfaktor Snail ist in diesen Zellen vorhanden (Daten nicht gezeigt) und könnte für die Repression von E-Cadherin verantwortlich sein. Die ebenfalls hier beschriebene konstitutive Aktivierung des MAP-Kinase-Wegs ist vermutlich mit für die ursprüngliche Expression von Snail verantwortlich. Neben diesen molekularen Markern weisen auch morphologische Aspekte dieser Zellen darauf hin, dass sie eine Transition hin zum mesenchymalen Zelltyp durchlaufen haben. Sie heben sich durch ihre lockere Streuung, fehlende Zell-Zelladhäsion sowie eine veränderte Morphologie deutlich von normalen Melanozyten ab. Zudem exprimieren die in dieser Arbeit verwendeten Melanomzellen Proteine, die mit gesteigerter Invasivität und dem Verlust von epithelialen Merkmalen auf Melanomzellen assoziiert sind. Zu diesen gehören tPA, MT1-MMP, Fibronectin und SPARC. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass diese Gene wichtig für die Migration, Invasion und Metastasierung von Melanomzellen sind. tPA und MT1-MMP zum Beispiel sind direkt oder indirekt an der Matrix-Degradation beteiligt (Saksela et al., 1984). Die Expression von SPARC korreliert mit der Transition des „radial growth phase“-Melanoms zum „vertical-growth-phase“-Melanom und die Synthese von Fibronectin schließlich hängt mit der verstärkten Zellproliferation von Melanomzellen zusammen (Ledda et al., 1997; Massi et al., 1999; Wollina et al., 1991). Die Expression dieser Gene unterstreicht die Transition der

Zellen zum mesenchymalen, invasiven Zelltyp. Zusammen weisen diese Daten also darauf hin, dass die von uns verwendete Melanomzelllinie auf molekularer und morphologischer Ebene jenen Zellen entspricht, die eine EMT durchlaufen haben, wie zuvor bereits für viele Tumore *in vivo* berichtet (Birchmeier and Behrens, 1994).

Die MIA-defizienten Zellen zeigen all diese Merkmale nicht. Sie bilden weiterhin ein zusammenhängendes Netz von Zellen und weisen keinerlei Umstrukturierungen, weder in den Adhäsionsmolekülen der Cadherin-Familie noch im Zytoskelett, auf. Auch zeigen sie keine Expression melanom-assoziiierter Gene und exprimieren wieder E-Cadherin (Poser et al., 2004). Der Verlust von MIA bewirkt also eine Redifferenzierung der Zellen: die Morphologie MIA-defizienter Zellen, die Expression melanozytärer Marker und der Verlust melanom-assoziiierter Gene lässt MIA-defiziente Melanomzellen mehr Melanozyten als Melanomzellen gleichen. Auch ist MIA an der Regulation von Genen beteiligt, die wiederum für die Ausbildung eines epithelialen oder mesenchymalen Phänotyps verantwortlich sind. MIA spielt somit eine erhebliche Rolle in der Akquirierung von invasiven Eigenschaften von Melanomzellen.

In wie weit MIA einen direkten Einfluss auf den Mechanismus der EMT nimmt ist noch unklar. Jedoch lässt die Umkehrbarkeit des Phänotyps durch Veränderung der MIA-Expression darauf schließen, dass MIA an der Regulation von Genen beteiligt ist, die wiederum für die Ausbildung eines epithelialen oder mesenchymalen Phänotyps verantwortlich sind. Ob MIA eine Rolle bei der EMT während der frühen Embryonalentwicklung spielt, muss noch untersucht werden.

### **5.1.2 MIA-defiziente Zellen exprimieren kein Integrin beta3 (ITGB3).**

Die Expression einiger Integrine, darunter vor allem die Expression von ITGB3, auf Tumorzellen wird mit invasiven, migratorischen und metastatischen Eigenschaften in Verbindung gebracht (Albelda et al., 1990) (siehe auch 2.1.5.2.2.1). Allerdings führt die Expression von Integrin beta3 in Melanozyten alleine nicht zur malignen Transformation der Zellen (Meier et al., 2003). Erst zu einem späteren Zeitpunkt in der Melanomentwicklung bewirkt die Expression von ITGB3 die Progression des „radial-growth-phase“-Melanoms (RGP) zum „vertical-growth-phase“-Melanom (VGP) (Guerry et al., 1993).

Das Integrin  $\alpha v \beta 3$  bindet an Fibronektin und hat eine wichtige Funktion bei der Zelladhäsion an und der Zellwanderung auf Fibronektin (Charo et al., 1990). Die Wechselwirkung von Integrin  $\alpha v \beta 3$  (Integrin  $\alpha v \beta 3$ ) mit dem Zytoskelett nach

Stimulierung der Integrine führt zur Polymerisierung des Aktin-Zytoskeletts und letztendlich zu Veränderungen in der Zellmorphologie und den migratorischen Eigenschaften (Seftor, 1998). Die Expression der beta3-Kette mit der alpha5-Kette auf Melanomzellen befähigt diese, aktives MMP-2 (Matrix Metalloproteinase) auf der Zelloberfläche zu binden und so die zelluläre Invasion durch Degradierung von Kollagen der extrazellulären Matrix zu induzieren (Brooks et al., 1996). *In vivo* Studien konnten zeigen, dass Integrin  $\alpha\beta3$  auf vielen Zellen mit migratorischen Eigenschaften exprimiert wird. So ist das Integrin auf den Zellen der Neuralleiste und den Melanomzellen zu finden (Hynes, 1992; Varner and Cheresch, 1996). Die Expression von Integrin  $\alpha\beta3$  auf Melanomzellen führt auch zur Expression von weiteren, die Invasivität steigernden Faktoren (Seftor et al., 1992).

Die beta3 Integrinkette (ITGB3) wird nur von HMB2 Melanomzellen, nicht jedoch von MIA-negativen Zellen exprimiert (siehe Abbildung 11). Die Expression von ITGB3 auf den Melanomzellen unterstreicht die Rolle von MIA bei der Akquisition des invasiven Charakters (siehe oben). Auch konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der Expressionslevel von ITGB3 mit der Malignität der Melanome zunimmt (siehe Abbildung 12). Welche Faktoren an der Expression von ITGB3 während der Progression vom RGP zum VGP beteiligt sind, ist noch nicht bekannt. Vorläufige Daten unserer Arbeitsgruppe weisen jedoch darauf hin, dass die Expression von ITGB3 durch den Transkriptionsfaktor Snail reguliert wird (Daten nicht gezeigt). Auch hat der MAP-Kinase-Weg einen gewissen Einfluss auf die Expression von ITGB3 (Woods et al., 2001). In nicht-transformierten Endothelzellen, Fibroblasten und humanen Tumorzelllinien führt die konstitutive Aktivierung des MAP-Kinase-Wegs zur Expression von ITGB3 (Woods et al., 2001). Weitere Studien zeigen, dass die Aktivierung von Integrinen eine Reihe von Signalwegen aktiviert, darunter den MAP-Kinase-Weg (Juliano et al., 2004), was eine positive Autoaktivierung der Integrinexpression möglich erscheinen lässt. In den in dieser Arbeit verwendeten Melanomzellen ist der MAP-Kinase-Weg in MIA abhängiger Form konstitutiv aktiv (siehe Abbildung 25). MIA könnte also die Expression von ITGB3 über den MAP-Kinase-Weg steuern. Andererseits ist es auch möglich, dass die Expression von ITGB3 in den MIA-positiven Melanomzellen für die konstitutive Aktivierung des MAP-Kinase-Wegs verantwortlich ist..

## ***5.2 MIA-defiziente Zellen ähneln in ihrer Morphologie Melanozyten.***

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Protein MIA die Morphologie von Zellen beeinflusst. Melanomzellen sind größer als MIA-defiziente Zellen (siehe Abbildung

10) und im Gegensatz zu den MIA-defizienten Zellklonen, die nur einen Zellkern besitzen, sind sie vielkernig (Tatzel et al., 2005). Auch Mielzynska und Kollegen haben bereits 1989 von der Vielkernigkeit in primären Melanomen und Melanommetastasen berichtet (Mielzynska et al., 1989). Die Ursache der beobachteten Vielkernigkeit könnte in Defekten der Zytokinese zu finden sein. Faktoren, die die Zytokinese regulieren, wurden jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht und werden Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

### ***5.3 MIA-defiziente Zellen sind pigmentiert.***

MIA-defiziente Zellen unterscheiden sich von Melanomzellen auch hinsichtlich ihrer Pigmentierung. MIA-defiziente Zellen sind dunkel pigmentiert und exprimieren pigmentierungs-relevante Gene, die Melanomzellen HMB2 jedoch weisen keine Pigmentierung auf. Außerdem zeigen MIA-defiziente Zellen ein reduziertes invasives Potential (Poser et al., 2004), was die Annahme, dass sich die Pigmentierung invers zum metastatischen Potential einer Zellen verhält (Sodi et al., 1998), untermauert.

Die Enzyme der Tyrosinase-Familie Tyrosinase und Trp-1 sind an der Pigmentierung der Melanozyten beteiligt (siehe auch 2.1.3.1). Tyrosinase nimmt dabei eine zentrale Rolle in der Pigmentierung ein (Vachtenheim et al., 2001). Darüber hinaus beeinflusst Trp-1 die Aufrechterhaltung der Melanosomenstruktur, die Proliferation und den Zelltod von Melanozyten (Kobayashi et al., 1998). Veränderungen in der Pigmentierung treten vor allem in primären Melanomen und Melanommetastasen auf (Halaban, 2002). In den meisten Melanomzelllinien wie auch in der Melanomzelllinie HMB2 fehlen die pigmentierungs-relevanten Proteine Tyrosinase und Trp-1 (siehe Abbildung 13 und 16) (Chen et al., 1995; Vachtenheim et al., 2001). Der Verlust der pigmentierungs-relevanten Gene wird mit genetischen und metabolischen Veränderungen in Zusammenhang gebracht, die während der Melanomentwicklung erfolgen (Halaban, 2002). MIA-defiziente Zellen unterscheiden sich in ihrer Gen- und Proteinexpression von Melanomzellen. Faktoren, die offensichtlich in MIA-defizienten Zellen die Regulation der pigmentierungs-relevanten Gene positiv beeinflussen, fehlen vermutlich in Melanomzellen (Eberle et al., 1995). Negative Regulatoren der Trp-1- und Tyrosinase-Expression wie zum Beispiel der Wachstumsfaktor bFGF werden von Melanomzellen exprimiert und beeinflussen die Transkription dieser Gene (Halaban et al., 1996). Die Expression der pigmentierungs-relevanten Gene und die Bildung reifer Melanosomen in MIA-defizienten Zellen unterstreicht die Ähnlichkeit MIA-defizienter Zellen zu Melanozyten. Der Verlust von pigmentierungs-relevanten Genen in Melanomen jedoch

geht einher mit der zunehmenden Malignität von Melanomen. Die Pigmentierung in Melanomzellen ist also abhängig von der Synthese positiver wie auch negativer Wachstums- und Transkriptionsfaktoren, deren Expression in Melanomzellen dereguliert ist.

### **5.3.1 Nur MIA-defiziente Zellen exprimieren MITF, einen wichtigen Regulator der Pigmentierung.**

MITF ist nicht nur für die Pigmentierung von Melanozyten wichtig. Es reguliert auch die Differenzierung und das Überleben von Melanozyten (Hodgkinson et al., 1993; Tachibana, 2000) (siehe auch 2.1.4.3 und 2.1.3.2.1). Der Transkriptionsfaktor reguliert die Expression der pigmentierungs-relevanten Gene Trp-1 und Tyrosinase durch Bindung an die M-Box im Promotorbereich der Gene. Eine Protein-Expression von MITF in MIA-positiven Zellen konnte allerdings nicht detektiert werden (siehe Abbildung 19). Da schon vorher postuliert wurde, dass die Transkription von Tyrosinase und anderen pigmentierungs-relevanten Genen in amelanotischen, Tyrosinase-negativen Melanomzellen durch Faktoren beeinflusst wird, die die Transkription und Expression des Transkriptionsfaktor MITF regulieren (Halaban, 2002), wurden in dieser Arbeit Faktoren untersucht, die auf Protein-Ebene die Stabilität und Aktivität von MITF regulieren.

#### ***5.3.1.1 Erk als Regulator der MITF-Stabilität***

Zu einer Induktion der transkriptionellen Aktivität von MITF und nachfolgenden Degradierung des Transkriptionsfaktors kommt es durch den MAP-Kinase-Signalweg (siehe auch 1.1.3.1). Dieser phosphoryliert MITF an Serin73 und Serin409, was zu einer kurzzeitigen Aktivierung des Transkriptionsfaktors und später zu dessen Degradation führt (Hemesath et al., 1998). Zielgene des MAP-Kinase-Wegs sind Transkriptionsfaktoren wie Ets-1, Elk-1 und c-myc. Sie regulieren die Proliferation und Transformation von Melanomzellen. Aber auch Rsk-1 ist ein Zielgen des MAP-Kinase-Wegs. Der MAP-Kinase-Weg ist teilweise schon in „radial-growth-phase“-Melanomen aktiv und induziert die Progression der Melanomzellen zum „vertical-growth-phase“-Melanom. Die konstitutive Aktivierung des MAP-Kinase-Wegs in Melanomzellen ist in einigen Fällen auf Mutationen in der Kinase-Domäne der Kinase BRAf zurückzuführen (Satyamoorthy et al., 2003). Mutationen im *BRAF* Gen führen zur Liganden-unabhängigen konstitutiven Aktivierung von BRAf und dem nachfolgenden MAP-Kinase-Weg (Satyamoorthy et al., 2003). Der MAP-

Kinase-Weg ist in Melanomzellen konstitutiv aktiv, in MIA-defizienten Zellen hingegen liegt der MAP-Kinase-Weg nicht aktiviert vor (siehe Abbildung 20). Da durch das Ausschalten der MIA-Expression in MIA-defizienten Zellen die Aktivierung der MAP-Kinase unterbleibt, ist davon auszugehen, dass MIA maßgeblich an der Regulation des MAP-Kinase-Wegs beteiligt ist und schon sehr früh auf dessen Aktivierung Einfluss nimmt. Die aktivierende Mutation von BRAF hat in MIA-defizienten Zellen also keinen Einfluss auf die Aktivierung des MAP-Kinase-Wegs. Für die reduzierte MITF-Konzentration auf Protein-Ebene könnte der MAP-Kinase-Weg also mit verantwortlich sein. Höchstwahrscheinlich spielen auch noch andere Faktoren wie PKC1 bei der Regulation der MITF Stabilität und seiner Aktivität eine Rolle (Levy et al., 2002). Denn trotz Stabilisierung des Transkriptionsfaktors MITF durch Inhibierung des MAP-Kinase-Signalwegs konnte die Transkription von Trp-1 und Tyrosinase nicht induziert werden.

#### ***5.3.1.2 PIAS3 wirkt auf MITF destabilisierend.***

PIAS3, der „protein-inhibitor of activated STAT3“, fungiert als Repressor der transkriptionellen Aktivität von Transkriptionsfaktoren wie STAT3 durch Bindung an deren DNA-bindende Domäne. Zudem besitzt PIAS3 eine Sumoligase-Aktivität, durch die die Stabilität und Funktion von Proteinen wie zum Beispiel IRF-1 reguliert werden kann (Nakagawa and Yokosawa, 2002; Wang and Banerjee, 2004). Als Repressor bindet PIAS3 an die „basic-helix-loop-helix leucine zipper“-Domäne von MITF (Levy et al., 2003) und inhibiert so die transkriptionelle Aktivität von MITF (Razin et al., 1999). In dem in unserer Arbeit verwendeten Zellsystem wird PIAS3 in Melanomzellen exprimiert (siehe Abbildung 21). Unterschiede in der MITF Expression konnten nur auf Protein-Ebene, nicht jedoch auf RNA-Ebene zwischen Melanomzellen und MIA-defizienten Zellen festgestellt werden (siehe Abbildung 18 und 19). Aufgrund der reduzierten Proteinmenge von MITF in Melanomzellen kann davon ausgegangen werden, dass die Bindung von PIAS3 an MITF destabilisierend auf den Transkriptionsfaktor wirkt, PIAS3 in Melanomzellen also als Sumoligase agiert und damit MITF destabilisiert. Dennoch scheint PIAS3 nicht allein ausschlaggebend für die Repression oder die Destabilisierung von MITF zu sein: die Inhibierung von funktionellem PIAS3 in den Melanomzellen durch stabile antisense-PIAS3-cDNA Transfektion führte nicht zu einer Reexpression von Trp-1 und Tyrosinase in Melanomzellen. Auch die Stabilisierung von MITF über Inhibition des MAP-Kinase-Signalwegs und gleichzeitige Hemmung des möglicherweise destabilisierenden Faktors PIAS3 führte nicht zur einer Expression von Trp-1



oder Tyrosinase. MIA scheint also in der Regulation der Pigmentierung eine wesentliche Rolle zu spielen: durch die Expression von MIA werden Faktoren und Signalwegen exprimiert, die die Induktion der Pigmentierung durch den Transkriptionsfaktor MITF inhibieren. Eine weitere Erklärung für die fehlende Reinduktion der pigmentierungsrelevanten Gene liefern Ballotti und Kollegen. Sie zeigen, dass die exogene MITF-Expression in MITF-negativen Maus-Melanomzellen nicht für eine Reexpression der Pigment-relevanten Gene Trp-1 und Tyrosinase ausreichend war (Gaggioli et al., 2003). Die Inhibierung von endogenem MITF in MITF-positiven Zellen jedoch blockierte die Expression von Trp-1 und Tyrosinase und führte zur Depigmentierung in diesen Zellen (Gaggioli et al., 2003). Diese Ergebnisse bestätigten Vachtenheim und Hou. Beide proklamieren, dass die forcierte Expression von MITF in verschiedenen MITF-defizienten Melanomzelllinien die Trp-1- und Tyrosinase-Expression in den Melanomzellen nicht induzieren kann (Hou et al., 2000; Vachtenheim et al., 2001). Da also durch die Stabilisierung von MITF und gleichzeitige Inhibierung von PIAS3 keine Induktion der Trp-1 beziehungsweise Tyrosinase Expression erzielt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass noch andere Faktoren an der Regulation pigmentierungs-relevanter Gene beteiligt sind.

Die Transkription der pigmentierungs-relevanten Gene sowie die Induktion der Melanogenese scheinen also einem Mechanismus zu unterliegen, an dem mehrere Faktoren, nicht nur MITF, beteiligt sind. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass MIA-defiziente Zellen den Transkriptionsfaktor MITF exprimieren, der sowohl eine zentrale Rolle in der Pigmentierung als auch in der Melanozytenentwicklung spielt. Weiter wurde dargelegt, dass Melanomzellen die Regulation pigmentierungs-relevanter Gene durch die Expression inhibierender Faktoren verhindern. Da die Regulation von MITF keine Induktion der Transkription von pigmentierungs-relevanten Gene erbrachte, wurden regulatorische Faktoren gesucht, die direkt die Transkription pigmentierungs-relevanter Gene beeinflussen.

### **5.3.2 PAX3 wird nur von MIA-defizienten Zellen exprimiert.**

Als weiterer regulatorischer Faktor pigmentierungs-relevanter Gene wurde der Transkriptionsfaktor PAX3 untersucht (siehe auch 2.1.3.2.2). Pax-Proteine sind für die Etablierung verschiedener Zelltypen wichtig. Zum Beispiel hat PAX3 eine wichtige Funktion in der Entwicklung proliferierender, melanozytärer Vorläuferzellen. Mutationen im PAX3-Gen führen zum Wardenburg-Syndrom, das durch Pigmentierungsdefekte und Verlust des Hörvermögens gekennzeichnet ist (Tassabehji et al., 1994). PAX3 bindet an den

Promotorbereich von Trp-1 und induziert dort dessen Transkription. In einem Großteil humaner Melanome wird PAX3 verstärkt exprimiert und trägt zum Überleben der Tumorzellen bei (Scholl et al., 2001). In der zitierten Studie wurden Patientenproben aus unterschiedlichen Tumorstadien auf die Expression von PAX3 auf mRNA-Ebene positiv getestet. Allerdings erwies sich in dieser Studie auch die Negativkontrolle positiv für die Expression von PAX3 – die Spezifität der angewandten Primer war also nicht gegeben und die erzielten Ergebnisse der Studie müssen mit Bedacht gewertet werden (Scholl et al., 2001). Im Gegensatz zu diesen Berichten konnte in der vorliegenden Arbeit eine Expression von PAX3 auf RNA-Ebene in Melanomzellen nicht festgestellt werden, was die fehlende Expression von Trp-1 erklärt (siehe Abbildung 30). Stattdessen wurde PAX3 auf RNA-Ebene in MIA-defizienten Zellklonen detektiert. MIA scheint die Induktion der Transkription also auch auf einer weiteren Ebene zu unterbinden.

Außer PAX3 scheinen aber noch weitere Faktoren an der Regulation der Pigmentierung beteiligt zu sein, denn eine Überexpression von PAX3 in den Melanomzellen war für die Re-Aktivierung der Expression des pigmentierungs-spezifischen Gens Trp-1 nicht ausreichend.

### **5.3.3 MIA induziert die Expression von Tbx-2.**

Untersuchungen zu weiteren regulatorischen Elementen des Trp-1 Promotors schließlich führten zu Tbx-2, dem brachyury-related transcription factor aus der T-Box Familie. Aus dieser Familie sind zwei Transkriptionsfaktoren bekannt, die als Inhibitoren der Transkription fungieren: Tbx-2 und Tbx-3. Tbx-2 bindet im Promotorbereich von Trp-1 an die MSEu- und MSEi-Box und verhindert die Transkription von Trp-1. In unserem Zellsystem wird Tbx-2 auf RNA-Ebene in Melanomzellen stärker exprimiert als in MIA-defizienten Zellen (siehe Abbildung 23). Tbx-2 könnte also in MIA-positiven Zellen als Repressor der Trp-1 Transkription fungieren und für die fehlende Expression von Trp-1 in den MIA-positiven Zellen verantwortlich sein. Die Inhibierung von Tbx-2 könnte der ausschlaggebende Faktor für die Induktion der Melanogenese in den Melanomzellen sein, da die Pigmentierung bisher weder durch Stabilisierung von Transkriptionsfaktoren, noch durch Inhibierung von Repressoren oder die Transfektion von Aktivatoren induziert werden konnte. Weitere Untersuchungen zur Regulation der Tbx-2-Expression in MIA-positiven Zellen werden Auskunft darüber geben, wie MIA die Funktion von Tbx-2 reguliert, welche Faktoren an der Regulation von Tbx-2 noch beteiligt sind und auf welche Weise Tbx-2 in den Zellen agiert. In Abbildung 25 ist schematisch dargestellt, welche Faktoren bei der Pigmentierung eine Rolle

spielen (A). In Abbildung 25 (B) sind die Bedingungen in der Melanomzelle aufgezeigt. Diese führen zur Inhibierung der Transkription pigmentierung-relevanter Gene.

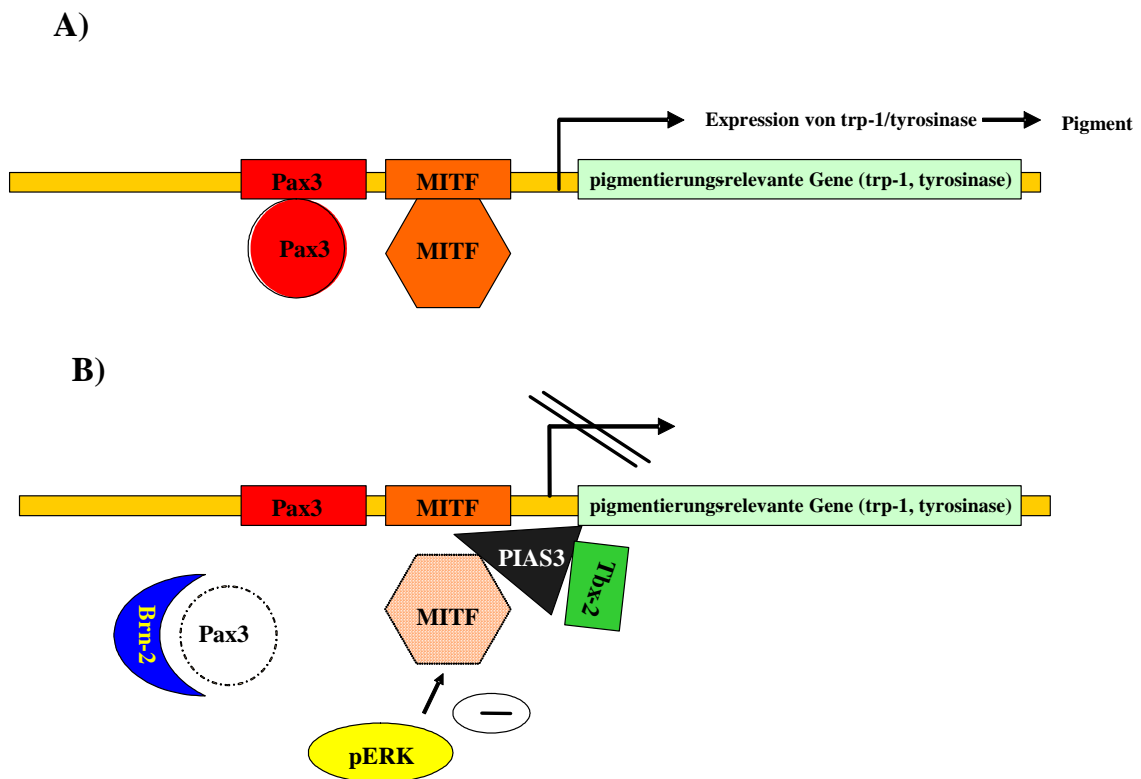


Abbildung 25: Überblick über die Faktoren der Pigmentierung in A) MIA-defizienten Zellen und B) Melanomzellen. In MIA-defizienten Zellen (A) induzieren die Faktoren PAX3 und MITF die Transkription von Trp-1 und Tyrosinase. In Melanomzellen (B) verhindert PIAS3 die Bindung von MITF an den Promoter von Trp-1 beziehungsweise Tyrosinase. Der MAP-Kinase-Weg ist außerdem für die Destabilisierung von MITF verantwortlich. Welche Rolle Brn-2 in der Pigmentierung einnimmt, ist noch nicht genau geklärt: Brn-2 kann PAX3 binden, allerdings wird dieser in Melanomzellen nicht exprimiert. Tbx-2 wirkt auf die Transkription von Trp-1 inhibierend.

#### ***5.4 MIA reguliert die Expression des Pou-Transkriptionsfaktor Brn-2.***

Brn-2, ein Mitglied der Familie der Pou-Transkriptionsfaktoren, wird verstärkt in Melanomzellen exprimiert (siehe auch 2.1.3.2.2). Brn-2 fördert die Proliferation der Melanomzellen (Goodall et al., 2004b) und scheint an der Regulation der Pigmentierung beteiligt zu sein (Thomson et al., 1995). Reguliert wird Brn-2 über die zwei Signalwege, die im Melanom sehr häufig konstitutiv aktiv sind: den Wnt/ $\beta$ -catenin- und den MAP-Kinase-

Signalweg, der in MIA-positiven Zellen konstitutiv aktiv ist. Die Gruppe um Thomson konnte belegen, dass Brn-2 wichtig für das Schicksal der melanozytären Linie, für die Bildung von Tumoren und zudem für die Transkription pigmentierungs-relevanter Gene wie Tyrosinase, Trp-1 und MITF ist (Thomson et al., 1995). Diese Ergebnisse wurden durch die Gruppe von Smit bestätigt und noch weiter untersucht. Die Gruppe fand heraus, dass Brn-2 sowohl mit PAX3 als auch Sox10, beides Faktoren, die in der Melanogenese und der Entwicklung der Melanozyten wichtig sind, interagiert und so Einfluss auf die Genexpression in Melanozyten nehmen kann (Smit et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Brn-2 auf Protein-Ebene in den MIA-positiven Zellen, kaum jedoch in MIA-defizienten Zellen exprimiert wird (siehe Abbildung 24). Brn-2 ist also Teil des Pigmentierungs-Netzwerks aus Transkriptionsfaktoren und Signalwegen, die in MIA-positiven Zellen dysreguliert sind. Weitere Untersuchungen zur Expression und Funktion von Brn-2 sind jedoch nötig, um seine genaue Rolle in der Entstehung des Malignen Melanoms, seinen Beitrag zur Entstehung der melanozytären Linie und vor allem seine Regulation durch das Protein MIA zu verstehen.

### ***5.5 MIA als Regulator der Chromatinstruktur?***

Die neoplastische Transformation ist gekennzeichnet durch eine deregulierte Zellproliferation und ein verändertes Apoptosemuster (Espino et al., 2005). Diese Merkmale der Tumorentstehung gehen auf genetische Veränderungen zurück, wie zum Beispiel Mutationen von Tumorsuppressorgenen. Sie können aber auch mit Modifikationen einhergehen, die die Struktur der DNA betreffen, aber nicht die DNA-Sequenz beeinflussen (Espino et al., 2005). Epigenetische Mechanismen, die in Tumorzellen oft verändert sind, betreffen zum Beispiel die Modifikationen von Histonen des Chromatins (Espino et al., 2005).

Chromatin besteht aus in Nukleosomen verpackter DNA. Nukleosomen wiederum werden aus DNA und einem Proteinkomplex, dem sogenannten Core-Protein, aufgebaut. Das Core-Protein besteht aus acht Histonen. Um dieses Oktamer windet sich die DNA 1,75 mal (Kornberg, 1974). Posttranslationelle Modifikationen wie die Acetylierung und Deacetylierung der Histone bestimmen, wie eng die Nukleosomen gepackt sind. Der Packungsgrad entscheidet, wie zugänglich die DNA für Transkriptionsfaktoren ist und somit, ob ein DNA Segment oft oder eher selten transkribiert wird (Grunstein, 1997). Histonacetyltransferasen (HAT) sind für die Acetylierung des N-terminalen Lysinrests von Histon H3 verantwortlich, Histondeacetylasen (HDAC) entfernen die Acetylgruppe wieder (Davie, 1998). Durch die Histonacetylierung und der damit verbundenen

Ladungsverschiebung wird die Bindung der DNA an die Histone gelockert. Die Chromatinstruktur entspannt sich, fördert so den Zugang DNA-bindender Faktoren und erleichtert so die Transkription der DNA (Cho et al., 2004). Die Entfernung der Acetylgruppe durch HDACs stellt die ursprünglichen Ladungsverhältnisse wieder her: das Chromatin kondensiert, DNA-bindende Faktoren, regulatorische Komplexe und die RNA-Polymerase können nicht mehr an die DNA binden (Davie, 1998).

HDACs können direkt an Ziel-DNA binden, sie können aber auch an Transkriptionsfaktoren binden und damit indirekt die Transkription von Zielgenen regulieren. (Gu and Roeder, 1997). Ein Beispiel für die indirekte Inhibierung der Transkription und die Beteiligung der HDACs an der Zellzyklus-Regulation stellt die transkriptionelle Repression des Transkriptionsfaktors E2F dar. Die Bindung von Rb an den Transkriptionsfaktor E2F bewirkt die Akkumulierung von zwei HDACs (Luo et al., 1998) und verhindert damit die Transkription der Zielgene von E2F. Auch Tbx-2 induziert die Repression von Zielgenen wie Trp1 und dem Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitor p21/waf/Cip1 durch die Rekrutierung einer Deacetylase. Diese transkriptionelle Inaktivierung Zellzyklus-regulierender Gene wie p21 verhindert die Seneszenz und Apoptose von Zellen. Die Regulation von p21/waf1/Cip1 durch HDACs ist also ein gutes Beispiel für die Beteiligung der HDACs an der Zellzykluskontrolle. Es ist bekannt, dass Mutationen von HATs und HDACs für die Entstehung von Krankheiten verantwortlich sein können (Muraoka et al., 1996). Beim Dickdarmkrebs zum Beispiel kommt es aufgrund von genetischen Mutationen und folgendem Funktionsverlusts des Tumorsuppressors APC (Adenomatosis Polypolis Coli) zu einer vermehrten Expression von HDAC2. Anomale HDAC Aktivität wurde auch in einigen anderen Tumorerkrankungen nachgewiesen und wird mit der Inhibierung von Tumorsuppressorgenen und der Tumorinduktion in Zusammenhang gebracht (Klisovic et al., 2003). Der Einsatz von HDAC-Inhibitoren in der Tumorbekämpfung wird derzeit erprobt (Marks et al., 2001). Die Zugabe von HDAC-Inhibitoren bewirkt die Transkription von Tumorsuppressorgenen und reprimiert tumorfördernde Faktoren (Van Lint et al., 1996). Der Einsatz von Trichostatin A (TSA), einem niedermolekularen mikrobiellen Stoff zum Beispiel, bewirkt bereits in geringen Konzentrationen den Arrest von Tumorzellen in der G1 und G2 Phase des Zellzyklus. Außerdem konnte gezeigt werden, dass TSA die Differenzierung von Zellen beeinflusst und die Morphologie transformierter Zellen verändert (Yoshida et al., 1995). Generell wurde durch die Behandlung von Zellen mit HDAC-Inhibitoren die Proliferation transformierter Zellen gestoppt, und im Tiermodell das Tumorstadium inhibiert (Yoshida et al., 1990).

Die Behandlung von den in dieser Arbeit verwendeten Melanomzellen mit TSA führte zu morphologischen Veränderungen: die Zellen zeigten dendritische Fortsätze und ähnelten in ihrer Morphologie Melanozyten (siehe auch 4.6). Dennoch konnte eine Aktivierung der Transkription vor allem von pigmentierungs-relevanten Genen wie Trp-1 oder Tyrosinase, wie in MIA defizienten Zellen beobachtet, nicht induziert werden.

MIA scheint also nicht über eine globale Regulierung der Chromatinstruktur, sondern spezifisch auf die Expression der hier diskutierten Gene zu wirken. Um eine Beteiligung von MIA-abhängigen Mechanismen an der Regulation der allgemeinen Chromatinstruktur völlig ausschließen zu können, müssten jedoch weitere epigenetische Modifikationen wie Methylierung, Phosphorylierung, Sumoylierung oder Ubiquitinierung im Detail untersucht werden.

## **5.6 Funktionsweise von MIA**

Wie MIA die Veränderungen in der Morphologie, der Signaltransduktion und der Pigmentierung der Melanomzellen reguliert, ist bisher noch nicht geklärt. Bislang unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe Boßerhoff zeigen, dass MIA an Adhäsionsmoleküle aus der Familie der Integrine bindet (Veröffentlichung in Vorbereitung). Diese werden auf der Oberfläche von Zellen exprimiert und stehen im Zytoplasma mit dem Zytoskelett und zytoplasmatischen Proteinen in Verbindung (siehe oben). Mit ihrer extrazellulären Domäne binden sie an Komponenten der extrazellulären Matrix wie Fibronectin oder Laminin. Integrine sind für die Proliferation, das Überleben von Zellen, ihre Morphologie, Differenzierung und Wanderung wichtig (siehe auch 5.1.2). Aktivierte Integrine regulieren diese Prozesse durch Bindung und Aktivierung verschiedener Signalmoleküle. Aus der Literatur ist bekannt, dass aktivierte Integrine zum Beispiel eine Signal-verstärkende Wirkung auf den MAP-Kinase-Weg und hier vor allem auf die Kinase Erk besitzen (Schwartz and Assoian, 2001). In dem in dieser Arbeit verwendeten Zellsystem konnte eine konstitutive Aktivierung der MAP-Kinase Erk in den Melanomzellen HMB2 festgestellt werden, welche somit auf MIA induzierten Integrinsignalen beruhen könnte. Dieser Annahme widerspricht allerdings, dass die kurzzeitige Behandlung von Melanomzellen (Mel Im) mit MIA bis zu drei Stunden zu einer Reduktion der Aktivierung von Erk führt (unpublizierte Daten der Arbeitsgruppe Boßerhoff). Drei Stunden nach Behandlung sind keine Aktivierungsunterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen mehr zu detektieren. Der Mechanismus, der diesen Prozessen zugrunde liegt, ist

bislang ungeklärt. Jedoch scheint MIA kurzfristig die Aktivierung der Integrine und deren Bindung an die extrazelluläre Matrix zu blockieren und somit auch die Integrin-abhängige Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs herabzusetzen. Diese Blockade wird wahrscheinlich durch die Loslösung von MIA von den Integrinen durch Degradierung von MIA wieder aufgehoben.

Eine Möglichkeit für eine nicht direkt von MIA abhängige konstitutive Aktivierung des MAP-Kinase-Wegs in den Melanomzellen könnte auch mit dem MAP-Kinase-Inhibitor RKIP zusammenhängen. RKIP wird in primären Tumoren geringer exprimiert als in Melanozyten, in Metastasen hingegen kommt es zum Verlust von RKIP (Schuierer et al., 2004). Die konstitutive Aktivierung des MAP-Kinase-Wegs könnte also auf den Verlust des MAP-Kinase Inhibitors zurückzuführen sein. Ob der Verlust der RKIP Expression in Melanomzellen tatsächlich für diesen Effekt verantwortlich ist und ob diese Herunterregulierung vielleicht sogar MIA abhängig ist, bedarf weiterer Studien.

Warum nur die transiente Transfektion MIA-defizienter Zellen mit einem MIA-Expressionskonstrukt Veränderungen in der Morphologie, der Pigmentierung und auf molekularer Ebene mit sich bringt, nicht jedoch die Behandlung mit MIA Protein, bleibt weiterhin offen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass MIA vor allem lokal sezerniert wird und auch nur eine lokale Wirkung zeigt. Eine Behandlung von MIA-defizienten Zellen mit MIA Protein hingegen wirkt auf die gesamte Zelle, nicht jedoch konzentriert auf spezifische Regionen der Zelle. Auch kann die Sekretion von MIA einem bestimmten zeitlichen, zum Beispiel Zellzyklus abhängigen, Ablauf folgen, der durch die Zugabe von MIA auf die Zellen nicht eingehalten wird.

Die Regulierung der Expression von Genen, die zum einen schon während der frühen Embryonalentwicklung eine Rolle spielen, zum anderen aber erst in späteren Prozessen wie der Pigmentierung exprimiert werden, weist MIA eine übergeordnete Rolle in der Regulation von Genen zu.

## **5.7 Fazit und Ausblick**

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass MIA an der Entstehung von Melanomen beteiligt ist: Tumor-assoziierte Gene wie ITGB3, das maßgeblich an der Progression von Tumoren mitwirken, werden in MIA-defizienten Zellen nicht exprimiert. MIA-defiziente Zellen weisen im Gegensatz zu Melanomzellen einen melanozytären Phänotyp auf. In lichtmikroskopischen Aufnahmen ist eine dendritische Morphologie zu erkennen. Sie generieren reife Melanosomen der Stadien 3 und 4 und gehen untereinander Zell-Zellkontakte ein. Ihre Pigmentierung geht zurück auf das intakte Pigmentierungsnetzwerk aus pigmentierungsrelevanten Genen und Signalwegen und der fehlenden Expression von inhibitorischen Faktoren der Pigmentierung. Melanomzellen hingegen fördern ihre Proliferation über anti-apoptotische Signale und den MAP-Kinase-Weg.

Inwieweit MIA an der Regulation der Expression vor allem von ITGB3 beteiligt ist und welche weiteren Faktoren hierbei eine Rolle spielen, ist bislang unklar. Die Klonierung des ITGB3-Promotors und nachfolgende Promotoranalysen werden Auskunft geben über aktive Domänen im Promotor und über die Transkriptionsfaktoren, die für die Expression von ITGB3 verantwortlich sind. Vorläufige Daten zeigen, dass der Transkriptionsfaktor Snail aktivierend auf die ITGB3 Expression wirkt. Weitere Untersuchungen hinsichtlich dieses Transkriptionsfaktors stehen aber noch aus. Auch bieten sich Untersuchungen an, die die Vielkernigkeit in den Melanomzellen erklären könnte. Deregulationen zytokinetisch wichtiger Faktoren sollten auch untersucht werden.

MIA reguliert aber auch die Expression von Genen und Proteinen im Melanom, die während der Melanozytenentwicklung eine wichtige Rolle spielen. In Melanomzellen wird Brn-2 exprimiert, ein wichtiger Faktor für die Zelldifferenzierung. Faktoren, die in der frühen Entwicklung von Melanozyten eine wichtige Rolle spielen, wie eben Brn-2, könnten in die Regulation der Pigmentierung in den Melanomen erheblich eingreifen und sollten daher Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Auch muss die Expression weiterer Gene und Proteine näher analysiert werden, die für die frühe Zelldifferenzierung und Entwicklung von Bedeutung sind. Tbx-2 ist ein Faktor, der für die Zelldifferenzierung wichtig ist und dessen Regulation und Funktion in Melanomzellen genauer hinterfragt werden sollte. Vorläufige Daten belegen, dass MIA die Expression von Brn-2 und Tbx-2 schon auf RNA-Ebene reguliert. Weitere Untersuchungen jedoch sind nötig, die genaue Funktion von MIA in der Regulation dieser Gene zu verstehen. Ein weiterer Faktor aus der Familie der T-Box-Faktoren ist Tbx-3. Auch dieser Faktor ist für die frühe Entwicklung von Melanozyten von Bedeutung und soll im Hinblick auf die Entstehung von Melanomen untersucht werden.



Promotoranalysen zur Regulation von Brn-2, Tbx-2 und Tbx-3 könnten zudem Aufschluss über Transkriptionsfaktoren geben, die durch MIA reguliert werden.

## 6 Anhang

### 6.1 Abkürzungen

ABCDE	Regel zur Klassifikation von Melanomen
ALM	akrolentiginöses Melanom
APC	Adenomatosis Polypolis Coli
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Anti-Sense
bHLH	Basic Helix-Loop-Helix
BRaf	v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
Brn-2	Brain-2 gene
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CREB	cAMP responsive element-binding protein
cDNA	Copy DNA
Dct	Dopachromtautomerase
DHICA	5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EMT	Epitheliale- mesenchymale Transition
Erk	Extracellular signal-regulated kinase
Gsk3 $\beta$	Glycogen Synthase Kinase 3 beta
HAT	Histon Acetyltransferase
HDAC	Histon Deacetylase
ITGB3	Integrin beta 3
LEF1	Lymphoid-Enhancer-Binding-Protein 1
LMM	Lentigo-maligna Melanom
MAP-Kinase	Mitogen-Activated Protein Kinase
MC1R	Melanocortin Rezeptor 1
MITF	Microphthalmia-associated transcription factor
MIA	Melanoma Inhibitory Activity
MSH	Melanocyte-stimulation hormone
MT1-MMP	Membrane-typ 1 Matrix-Metalloproteinase
mRNA	Messenger RNA

NM	noduläres Melanom
PAX	Paired Box Gene
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PDGF	Platelet-Derived Growth factor
PIAS3	Protein Inhibitor of Activated Stat3
Rb	Retinoblastom
RGP	Radial growth phase
RNA	Ribonukleinsäure („ribonucleic acid“)
rpm	Umdrehungen pro Minute
Rsk	Ribosomal Protein S6 Kinase
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
Scf	Stem Cell Factor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPARC	Secreted protein acidic, rich in cysteine
SSM	superfiziell spreitendes Melanom
STAT	Signal transducer and activator of transcription
Tbx	T-Box protein
TCF	Transcription factor
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
tPA	Tissue-Type Plasminogen Activator
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp-1	Tyrosinase-related protein-1
TSA	Trichostatin
U	Units
UV	Ultraviolet
VGP	Vertical growth phase
WHO	World Health Organisation

## **6.2 Veröffentlichungen**

Ina Poser, Jutta Tatzel, Silke Kuphal and Anja K Bosserhoff

“Functional role of MIA in melanocytes and early development of melanoma”

Oncogene (2004) 23, 6115–6124

Jutta Tatzel, Ina Poser, Josef Schroeder and Anja K Bosserhoff

“Inhibition of melanoma inhibitory activity (MIA) expression in melanoma cells leads to molecular and phenotypic changes”

Pigment Cell Res. 2005 Apr;18(2):92-101

### 6.3 Literaturangaben

- Akhurst, R.J. and Derynck, R. (2001) *TGF-beta signaling in cancer--a double-edged sword. Trends Cell Biol, 11, S44-51.*
- Aksan, I. and Goding, C.R. (1998) *Targeting the microphthalmia basic helix-loop-helix-leucine zipper transcription factor to a subset of E-box elements in vitro and in vivo. Mol Cell Biol, 18, 6930-6938.*
- Albelda, S.M., Mette, S.A., Elder, D.E., Stewart, R., Damjanovich, L., Herlyn, M. and Buck, C.A. (1990) *Integrin distribution in malignant melanoma: association of the beta 3 subunit with tumor progression. Cancer Res, 50, 6757-6764.*
- Anfosso, F., Bardin, N., Frances, V., Vivier, E., Camoin-Jau, L., Sampol, J. and Dignat-George, F. (1998) *Activation of human endothelial cells via S-endo-1 antigen (CD146) stimulates the tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase p125(FAK). J Biol Chem, 273, 26852-26856.*
- Bentley, N.J., Eisen, T. and Goding, C.R. (1994) *Melanocyte-specific expression of the human tyrosinase promoter: activation by the microphthalmia gene product and role of the initiator. Mol Cell Biol, 14, 7996-8006.*
- Bertolotto, C., Bille, K., Ortonne, J.P. and Ballotti, R. (1996) *Regulation of tyrosinase gene expression by cAMP in B16 melanoma cells involves two CATGTG motifs surrounding the TATA box: implication of the microphthalmia gene product. J Cell Biol, 134, 747-755.*
- Birchmeier, W. and Behrens, J. (1994) *Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. Biochim Biophys Acta, 1198, 11-26.*
- Blesch, A., Bosserhoff, A.K., Apfel, R., Behl, C., Hessdoerfer, B., Schmitt, A., Jachimczak, P., Lottspeich, F., Buettner, R. and Bogdahn, U. (1994) *Cloning of a novel malignant melanoma-derived growth-regulatory protein, MIA. Cancer Res, 54, 5695-5701.*
- Bondurand, N., Pingault, V., Goerich, D.E., Lemort, N., Sock, E., Caignec, C.L., Wegner, M. and Goossens, M. (2000) *Interaction among SOX10, PAX3 and MITF, three genes altered in Waardenburg syndrome. Hum Mol Genet, 9, 1907-1917.*
- Bosserhoff, A.K. and Buettner, R. (2002) *Expression, function and clinical relevance of MIA (melanoma inhibitory activity). Histol Histopathol, 17, 289-300.*
- Bosserhoff, A.K., Golob, M., Buettner, R., Landthaler, M. and Hein, R. (1998) *[MIA ("melanoma inhibitory activity"). Biological functions and clinical relevance in malignant melanoma]. Hautarzt, 49, 762-769.*
- Bosserhoff, A.K., Hein, R., Bogdahn, U. and Buettner, R. (1996) *Structure and promoter analysis of the gene encoding the human melanoma-inhibiting protein MIA. J Biol Chem, 271, 490-495.*

- Brooks, P.C., Stromblad, S., Sanders, L.C., von Schalscha, T.L., Aimes, R.T., Stetler-Stevenson, W.G., Quigley, J.P. and Cheresch, D.A. (1996) Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin  $\alpha$  v  $\beta$  3. *Cell*, 85, 683-693.
- Busca, R. and Ballotti, R. (2000) Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res*, 13, 60-69.
- Cable, J., Jackson, I.J. and Steel, K.P. (1995) Mutations at the W locus affect survival of neural crest-derived melanocytes in the mouse. *Mech Dev*, 50, 139-150.
- Cadigan, K.M. (2002) Wnt signaling--20 years and counting. *Trends Genet*, 18, 340-342.
- Chabot, B., Stephenson, D.A., Chapman, V.M., Besmer, P. and Bernstein, A. (1988) The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. *Nature*, 335, 88-89.
- Charo, I.F., Nannizzi, L., Smith, J.W. and Cheresch, D.A. (1990) The vitronectin receptor  $\alpha$  v  $\beta$  3 binds fibronectin and acts in concert with  $\alpha$  5  $\beta$  1 in promoting cellular attachment and spreading on fibronectin. *J Cell Biol*, 111, 2795-2800.
- Chen, Y.T., Stockert, E., Tsang, S., Coplan, K.A. and Old, L.J. (1995) Immunophenotyping of melanomas for tyrosinase: implications for vaccine development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 8125-8129.
- Cho, K.S., Elizondo, L.I. and Boerkoel, C.F. (2004) Advances in chromatin remodeling and human disease. *Curr Opin Genet Dev*, 14, 308-315.
- Christofori, G. and Semb, H. (1999) The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci*, 24, 73-76.
- Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Cho, B.C., Donovan, P.J., Jenkins, N.A., Cosman, D., Anderson, D., Lyman, S.D. and Williams, D.E. (1990) Mast cell growth factor maps near the steel locus on mouse chromosome 10 and is deleted in a number of steel alleles. *Cell*, 63, 175-183.
- Davie, J.R. (1998) Covalent modifications of histones: expression from chromatin templates. *Curr Opin Genet Dev*, 8, 173-178.
- De Luca, M., D'Anna, F., Bondanza, S., Franzi, A.T. and Cancedda, R. (1988) Human epithelial cells induce human melanocyte growth in vitro but only skin keratinocytes regulate its proper differentiation in the absence of dermis. *J Cell Biol*, 107, 1919-1926.
- Derynck, R., Akhurst, R.J. and Balmain, A. (2001) TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet*, 29, 117-129.
- Dorsky, R.I., Moon, R.T. and Raible, D.W. (1998) Control of neural crest cell fate by the Wnt signalling pathway. *Nature*, 396, 370-373.

- Dorsky, R.I., Raible, D.W. and Moon, R.T. (2000) Direct regulation of nacre, a zebrafish *MITF* homolog required for pigment cell formation, by the Wnt pathway. *Genes Dev*, 14, 158-162.
- Dotto, G.P., Moellmann, G., Ghosh, S., Edwards, M. and Halaban, R. (1989) Transformation of murine melanocytes by basic fibroblast growth factor cDNA and oncogenes and selective suppression of the transformed phenotype in a reconstituted cutaneous environment. *J Cell Biol*, 109, 3115-3128.
- Dupin, E. and Le Douarin, N.M. (2003) Development of melanocyte precursors from the vertebrate neural crest. *Oncogene*, 22, 3016-3023.
- Eberle, J., Garbe, C., Wang, N. and Orfanos, C.E. (1995) Incomplete expression of the tyrosinase gene family (tyrosinase, TRP-1, and TRP-2) in human malignant melanoma cells in vitro. *Pigment Cell Res*, 8, 307-313.
- Englaro, W., Rezzonico, R., Durand-Clement, M., Lallemand, D., Ortonne, J.P. and Ballotti, R. (1995) Mitogen-activated protein kinase pathway and AP-1 are activated during cAMP-induced melanogenesis in B-16 melanoma cells. *J Biol Chem*, 270, 24315-24320.
- Espino, P.S., Drohic, B., Dunn, K.L. and Davie, J.R. (2005) Histone modifications as a platform for cancer therapy. *J Cell Biochem*, 94, 1088-1102.
- Friedman, R.J., Heilman, E.R., Rigel, D.S. and Kopf, A.W. (1985) The dysplastic nevus. Clinical and pathologic features. *Dermatol Clin*, 3, 239-249.
- Gaggioli, C., Busca, R., Abbe, P., Ortonne, J.P. and Ballotti, R. (2003) Microphthalmia-associated transcription factor (*MITF*) is required but is not sufficient to induce the expression of melanogenic genes. *Pigment Cell Res*, 16, 374-382.
- Ganss, R., Schutz, G. and Beermann, F. (1994) The mouse tyrosinase gene. Promoter modulation by positive and negative regulatory elements. *J Biol Chem*, 269, 29808-29816.
- Geissler, E.N., Ryan, M.A. and Housman, D.E. (1988) The dominant-white spotting (W) locus of the mouse encodes the c-kit proto-oncogene. *Cell*, 55, 185-192.
- Goding, C.R. (2000) *Mitf* from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes Dev*, 14, 1712-1728.
- Goodall, J., Martinozzi, S., Dexter, T.J., Champeval, D., Carreira, S., Larue, L. and Goding, C.R. (2004a) *Brn-2* Expression Controls Melanoma Proliferation and Is Directly Regulated by  $\beta$ -Catenin. *Mol. Cell. Biol.*, 24, 2915-2922.
- Goodall, J., Wellbrock, C., Dexter, T.J., Roberts, K., Marais, R. and Goding, C.R. (2004b) The *Brn-2* transcription factor links activated BRAF to melanoma proliferation. *Mol Cell Biol*, 24, 2923-2931.
- Grunstein, M. (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*, 389, 349-352.

- Gu, W. and Roeder, R.G. (1997) Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell*, 90, 595-606.
- Guerry, D.t., Synnestvedt, M., Elder, D.E. and Schultz, D. (1993) Lessons from tumor progression: the invasive radial growth phase of melanoma is common, incapable of metastasis, and indolent. *J Invest Dermatol*, 100, 342S-345S.
- Halaban, R. (2002) Pigmentation in melanomas: changes manifesting underlying oncogenic and metabolic activities. *Oncol Res*, 13, 3-8.
- Halaban, R., Bohm, M., Dotto, P., Moellmann, G., Cheng, E. and Zhang, Y. (1996) Growth regulatory proteins that repress differentiation markers in melanocytes also downregulate the transcription factor microphthalmia. *J Invest Dermatol*, 106, 1266-1272.
- Hearing, V.J. (1999) Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 4, 24-28.
- Hemesath, T.J., Price, E.R., Takemoto, C., Badalian, T. and Fisher, D.E. (1998) MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-Kit signalling in melanocytes. *Nature*, 391, 298-301.
- Hemesath, T.J., Steingrimsson, E., McGill, G., Hansen, M.J., Vaught, J., Hodgkinson, C.A., Arnheiter, H., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Fisher, D.E. (1994) microphthalmia, a critical factor in melanocyte development, defines a discrete transcription factor family. *Genes Dev*, 8, 2770-2780.
- Herbarth, B., Pingault, V., Bondurand, N., Kuhlbrodt, K., Hermans-Borgmeyer, I., Puliti, A., Lemort, N., Goossens, M. and Wegner, M. (1998) Mutation of the Sry-related Sox10 gene in Dominant megacolon, a mouse model for human Hirschsprung disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 5161-5165.
- Herlyn, M., Berking, C., Li, G. and Satyamoorthy, K. (2000) Lessons from melanocyte development for understanding the biological events in naevus and melanoma formation. *Melanoma Res*, 10, 303-312.
- Herlyn, M. and Shih, I.M. (1994) Interactions of melanocytes and melanoma cells with the microenvironment. *Pigment Cell Res*, 7, 81-88.
- Hodgkinson, C.A., Moore, K.J., Nakayama, A., Steingrimsson, E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Arnheiter, H. (1993) Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell*, 74, 395-404.
- Hou, L., Panthier, J.J. and Arnheiter, H. (2000) Signaling and transcriptional regulation in the neural crest-derived melanocyte lineage: interactions between KIT and MITF. *Development*, 127, 5379-5389.
- Hsu, M.Y., Meier, F. and Herlyn, M. (2002) Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host. *Differentiation*, 70, 522-536.



- Hsu, M.Y., Wheelock, M.J., Johnson, K.R. and Herlyn, M. (1996) Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 1, 188-194.
- Huang, S., Jean, D., Luca, M., Tainsky, M.A. and Bar-Eli, M. (1998) Loss of AP-2 results in downregulation of c-KIT and enhancement of melanoma tumorigenicity and metastasis. *Embo J*, 17, 4358-4369.
- Hughes, M.J., Lingrel, J.B., Krakowsky, J.M. and Anderson, K.P. (1993) A helix-loop-helix transcription factor-like gene is located at the mi locus. *J Biol Chem*, 268, 20687-20690.
- Hynes, R.O. (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69, 11-25.
- Hynes, R.O. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110, 673-687.
- Ikeya, M., Lee, S.M., Johnson, J.E., McMahon, A.P. and Takada, S. (1997) Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors. *Nature*, 389, 966-970.
- Jimbow, K. (1995) Current update and trends in melanin pigmentation and melanin biology. *Keio J Med*, 44, 9-18.
- Johnson, J.P., Bar-Eli, M., Jansen, B. and Markhof, E. (1997) Melanoma progression-associated glycoprotein MUC18/MCAM mediates homotypic cell adhesion through interaction with a heterophilic ligand. *Int J Cancer*, 73, 769-774.
- Johnson, J.P., Stade, B.G., Holzmann, B., Schwable, W. and Riethmuller, G. (1989) De novo expression of intercellular-adhesion molecule 1 in melanoma correlates with increased risk of metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 641-644.
- Juliano, R.L., Reddig, P., Alahari, S., Edin, M., Howe, A. and Aplin, A. (2004) Integrin regulation of cell signalling and motility. *Biochem Soc Trans*, 32, 443-446.
- Keehn, C.A., Smoller, B.R. and Morgan, M.B. (2003) Expression of the *ets-1* proto-oncogene in melanocytic lesions. *Mod Pathol*, 16, 772-777.
- Kim, D.S., Kim, S.Y., Chung, J.H., Kim, K.H., Eun, H.C. and Park, K.C. (2002) Delayed ERK activation by ceramide reduces melanin synthesis in human melanocytes. *Cell Signal*, 14, 779-785.
- Klisovic, D.D., Katz, S.E., Efron, D., Klisovic, M.I., Wickham, J., Parthun, M.R., Guimond, M. and Marcucci, G. (2003) Depsipeptide (FR901228) inhibits proliferation and induces apoptosis in primary and metastatic human uveal melanoma cell lines. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44, 2390-2398.
- Knecht, A.K. and Bronner-Fraser, M. (2002) Induction of the neural crest: a multigene process. *Nat Rev Genet*, 3, 453-461.
- Kobayashi, T., Imokawa, G., Bennett, D.C. and Hearing, V.J. (1998) Tyrosinase stabilization by *Tyrp1* (the brown locus protein). *J Biol Chem*, 273, 31801-31805.

- Kobayashi, T., Urabe, K., Winder, A., Jimenez-Cervantes, C., Imokawa, G., Brewington, T., Solano, F., Garcia-Borron, J.C. and Hearing, V.J. (1994) Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. *Embo J*, 13, 5818-5825.
- Koehler, M.R., Bosserhoff, A., von Beust, G., Bauer, A., Blesch, A., Buettner, R., Schlegel, J., Bogdahn, U. and Schmid, M. (1996) Assignment of the human melanoma inhibitory activity gene (MIA) to 19q13.32-q13.33 by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Genomics*, 35, 265-267.
- Kornberg, R.D. (1974) Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science*, 184, 868-871.
- Ledda, M.F., Adris, S., Bravo, A.I., Kairiyama, C., Bover, L., Chernajovsky, Y., Mordoh, J. and Podhajcer, O.L. (1997) Suppression of SPARC expression by antisense RNA abrogates the tumorigenicity of human melanoma cells. *Nat Med*, 3, 171-176.
- Lee, M., Goodall, J., Verastegui, C., Ballotti, R. and Goding, C.R. (2000) Direct regulation of the Microphthalmia promoter by Sox10 links Waardenburg-Shah syndrome (WS4)-associated hypopigmentation and deafness to WS2. *J Biol Chem*, 275, 37978-37983.
- Lee, Z.H., Hou, L., Moellmann, G., Kuklinska, E., Antol, K., Fraser, M., Halaban, R. and Kwon, B.S. (1996) Characterization and subcellular localization of human Pmel 17/silver, a 110-kDa (pre)melanosomal membrane protein associated with 5,6,-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) converting activity. *J Invest Dermatol*, 106, 605-610.
- Levy, C., Nechushtan, H. and Razin, E. (2002) A New Role for the STAT3 Inhibitor, PIAS3. A REPRESSOR OF MICROPHthalmia TRANSCRIPTION FACTOR. *J. Biol. Chem.*, 277, 1962-1966.
- Levy, C., Sonnenblick, A. and Razin, E. (2003) Role played by microphthalmia transcription factor phosphorylation and its Zip domain in its transcriptional inhibition by PIAS3. *Mol Cell Biol*, 23, 9073-9080.
- Lister, J.A., Close, J. and Raible, D.W. (2001) Duplicate mitf genes in zebrafish: complementary expression and conservation of melanogenic potential. *Dev Biol*, 237, 333-344.
- Luo, R.X., Postigo, A.A. and Dean, D.C. (1998) Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell*, 92, 463-473.
- Mansky, K.C., Marfatia, K., Purdom, G.H., Luchin, A., Hume, D.A. and Ostrowski, M.C. (2002) The microphthalmia transcription factor (MITF) contains two N-terminal domains required for transactivation of osteoclast target promoters and rescue of mi mutant osteoclasts. *J Leukoc Biol*, 71, 295-303.
- Marks, M.S. and Seabra, M.C. (2001) The melanosome: membrane dynamics in black and white. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 738-748.

- 
- Marks, P.A., Richon, V.M., Breslow, R. and Rifkind, R.A. (2001) Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs. *Curr Opin Oncol*, 13, 477-483.
- Massi, D., Franchi, A., Borgognoni, L., Reali, U.M. and Santucci, M. (1999) Osteonectin expression correlates with clinical outcome in thin cutaneous malignant melanomas. *Hum Pathol*, 30, 339-344.
- Meier, F., Caroli, U., Satyamoorthy, K., Schitteck, B., Bauer, J., Berking, C., Moller, H., Maczey, E., Rassner, G., Herlyn, M. and Garbe, C. (2003) Fibroblast growth factor-2 but not Mel-CAM and/or beta3 integrin promotes progression of melanocytes to melanoma. *Exp Dermatol*, 12, 296-306.
- Meier, F., Satyamoorthy, K., Nesbit, M., Hsu, M.Y., Schitteck, B., Garbe, C. and Herlyn, M. (1998) Molecular events in melanoma development and progression. *Front Biosci*, 3, D1005-1010.
- Mielzynska, I., Smok-Ragankiewicz, A. and Szczurek, Z. (1989) [Cytologic prints of primary and metastatic melanomas. Preliminary report]. *Patol Pol*, 40, 181-185.
- Muraoka, M., Konishi, M., Kikuchi-Yanoshita, R., Tanaka, K., Shitara, N., Chong, J.M., Iwama, T. and Miyaki, M. (1996) p300 gene alterations in colorectal and gastric carcinomas. *Oncogene*, 12, 1565-1569.
- Nakagawa, K. and Yokosawa, H. (2002) PIAS3 induces SUMO-1 modification and transcriptional repression of IRF-1. *FEBS Lett*, 530, 204-208.
- Nakagawa, S. and Takeichi, M. (1995) Neural crest cell-cell adhesion controlled by sequential and subpopulation-specific expression of novel cadherins. *Development*, 121, 1321-1332.
- Nesbit, M., Nesbit, H.K., Bennett, J., Andl, T., Hsu, M.Y., Dejesus, E., McBrien, M., Gupta, A.R., Eck, S.L. and Herlyn, M. (1999) Basic fibroblast growth factor induces a transformed phenotype in normal human melanocytes. *Oncogene*, 18, 6469-6476.
- Nieto, M.A. (2002) The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 155-166.
- Novikoff, A.B., Albala, A. and Biempica, L. (1968) Ultrastructural and cytochemical observations on B-16 and Harding-Passey mouse melanomas. The origin of premelanosomes and compound melanosomes. *J Histochem Cytochem*, 16, 299-319.
- Opdecamp, K., Nakayama, A., Nguyen, M.T., Hodgkinson, C.A., Pavan, W.J. and Arnheiter, H. (1997) Melanocyte development in vivo and in neural crest cell cultures: crucial dependence on the Mitf basic-helix-loop-helix-zipper transcription factor. *Development*, 124, 2377-2386.
- Orlow, S.J., Boissy, R.E., Moran, D.J. and Pifko-Hirst, S. (1993) Subcellular distribution of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1: implications for melanosomal biogenesis. *J Invest Dermatol*, 100, 55-64.
- Pandolfi, F., Trentin, L., Boyle, L.A., Stamenkovic, I., Byers, H.R., Colvin, R.B. and Kurnick, J.T. (1992) Expression of cell adhesion molecules in human melanoma
-

- cell lines and their role in cytotoxicity mediated by tumor-infiltrating lymphocytes. Cancer, 69, 1165-1173.*
- Peinado, H., Portillo, F. and Cano, A. (2004) Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. Int J Dev Biol, 48, 365-375.*
- Pingault, V., Bondurand, N., Kuhlbrodt, K., Goerich, D.E., Prehu, M.O., Puliti, A., Herbarth, B., Hermans-Borgmeyer, I., Legius, E., Matthijs, G., Amiel, J., Lyonnet, S., Ceccherini, I., Romeo, G., Smith, J.C., Read, A.P., Wegner, M. and Goossens, M. (1998) SOX10 mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease. Nat Genet, 18, 171-173.*
- Planque, N., Turque, N., Opdecamp, K., Bailly, M., Martin, P. and Saule, S. (1999) Expression of the microphthalmia-associated basic helix-loop-helix leucine zipper transcription factor Mi in avian neuroretina cells induces a pigmented phenotype. Cell Growth Differ, 10, 525-536.*
- Poser, I., Dominguez, D., de Herreros, A.G., Varnai, A., Buettner, R. and Bosserhoff, A.K. (2001) Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail. J Biol Chem, 276, 24661-24666.*
- Poser, I., Golob, M., Buettner, R. and Bosserhoff, A.K. (2003) Upregulation of HMGI leads to melanoma inhibitory activity expression in malignant melanoma cells and contributes to their malignancy phenotype. Mol Cell Biol, 23, 2991-2998.*
- Poser, I., Golob, M., Weidner, M., Buettner, R. and Bosserhoff, A.K. (2002) Down-regulation of COOH-terminal binding protein expression in malignant melanomas leads to induction of MIA expression. Cancer Res, 62, 5962-5966.*
- Poser, I., Tatzel, J., Kuphal, S. and Bosserhoff, A.K. (2004) Functional role of MIA in melanocytes and early development of melanoma. Oncogene, 23, 6115-6124.*
- Potterf, S.B., Furumura, M., Dunn, K.J., Arnheiter, H. and Pavan, W.J. (2000) Transcription factor hierarchy in Waardenburg syndrome: regulation of MITF expression by SOX10 and PAX3. Hum Genet, 107, 1-6.*
- Potterf, S.B., Mollaaghababa, R., Hou, L., Southard-Smith, E.M., Hornyak, T.J., Arnheiter, H. and Pavan, W.J. (2001) Analysis of SOX10 function in neural crest-derived melanocyte development: SOX10-dependent transcriptional control of dopachrome tautomerase. Dev Biol, 237, 245-257.*
- Price, E.R., Ding, H.F., Badalian, T., Bhattacharya, S., Takemoto, C., Yao, T.P., Hemesath, T.J. and Fisher, D.E. (1998) Lineage-specific signaling in melanocytes. C-kit stimulation recruits p300/CBP to microphthalmia. J Biol Chem, 273, 17983-17986.*
- Pusch, C., Hustert, E., Pfeifer, D., Sudbeck, P., Kist, R., Roe, B., Wang, Z., Balling, R., Blin, N. and Scherer, G. (1998) The SOX10/Sox10 gene from human and mouse: sequence, expression, and transactivation by the encoded HMG domain transcription factor. Hum Genet, 103, 115-123.*

- Raposo, G. and Marks, M.S. (2002) *The dark side of lysosome-related organelles: specialization of the endocytic pathway for melanosome biogenesis. Traffic*, 3, 237-248.
- Raposo, G., Tenza, D., Murphy, D.M., Berson, J.F. and Marks, M.S. (2001) *Distinct protein sorting and localization to premelanosomes, melanosomes, and lysosomes in pigmented melanocytic cells. J Cell Biol*, 152, 809-824.
- Razin, E., Zhang, Z.C., Nechushtan, H., Frenkel, S., Lee, Y.N., Arudchandran, R. and Rivera, J. (1999) *Suppression of microphthalmia transcriptional activity by its association with protein kinase C-interacting protein 1 in mast cells. J Biol Chem*, 274, 34272-34276.
- Read, A.P. and Newton, V.E. (1997) *Waardenburg syndrome. J Med Genet*, 34, 656-665.
- Saito, H., Takeda, K., Yasumoto, K., Ohtani, H., Watanabe, K., Takahashi, K., Fukuzaki, A., Arai, Y., Yamamoto, H. and Shibahara, S. (2003) *Germ cell-specific expression of microphthalmia-associated transcription factor mRNA in mouse testis. J Biochem (Tokyo)*, 134, 143-150.
- Saksela, O., Vaheri, A., Schleuning, W.D., Mignatti, P. and Barlati, S. (1984) *Plasminogen activators, activation inhibitors and alpha 2-macroglobulin produced by cultured normal and malignant human cells. Int J Cancer*, 33, 609-616.
- Sato, S., Roberts, K., Gambino, G., Cook, A., Kouzarides, T. and Goding, C.R. (1997) *CBP/p300 as a co-factor for the Microphthalmia transcription factor. Oncogene*, 14, 3083-3092.
- Satyamoorthy, K., Li, G., Gerrero, M.R., Brose, M.S., Volpe, P., Weber, B.L., Van Belle, P., Elder, D.E. and Herlyn, M. (2003) *Constitutive mitogen-activated protein kinase activation in melanoma is mediated by both BRAF mutations and autocrine growth factor stimulation. Cancer Res*, 63, 756-759.
- Schaffer, J.V., Rigel, D.S., Kopf, A.W. and Bolognia, J.L. (2004) *Cutaneous melanoma--past, present, and future. J Am Acad Dermatol*, 51, S65-69.
- Scholl, F.A., Kamarashev, J., Murmann, O.V., Geertsen, R., Dummer, R. and Schafer, B.W. (2001) *PAX3 is expressed in human melanomas and contributes to tumor cell survival. Cancer Res*, 61, 823-826.
- Schuijter, M.M., Bataille, F., Hagan, S., Kolch, W. and Bosserhoff, A.K. (2004) *Reduction in Raf kinase inhibitor protein expression is associated with increased Ras-extracellular signal-regulated kinase signaling in melanoma cell lines. Cancer Res*, 64, 5186-5192.
- Schwartz, M.A. and Assoian, R.K. (2001) *Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways. J Cell Sci*, 114, 2553-2560.
- Seftor, R.E. (1998) *Role of the beta3 integrin subunit in human primary melanoma progression: multifunctional activities associated with alpha(v)beta3 integrin expression. Am J Pathol*, 153, 1347-1351.

- Seftor, R.E., Seftor, E.A., Gehlsen, K.R., Stetler-Stevenson, W.G., Brown, P.D., Ruoslahti, E. and Hendrix, M.J. (1992) Role of the  $\alpha v \beta 3$  integrin in human melanoma cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 1557-1561.
- Shibahara, S., Takeda, K., Yasumoto, K., Udono, T., Watanabe, K., Saito, H. and Takahashi, K. (2001) Microphthalmia-associated transcription factor (MITF): multiplicity in structure, function, and regulation. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 6, 99-104.
- Singh, R.K., Gutman, M. and Radinsky, R. (1995) Heterogeneity of cytokine and growth factor gene expression in human melanoma cells with different metastatic potentials. *J Interferon Cytokine Res*, 15, 81-87.
- Smit, D.J., Smith, A.G., Parsons, P.G., Muscat, G.E.O. and Sturm, R.A. (2000) Domains of Brn-2 that mediate homodimerization and interaction with general and melanocytic transcription factors. *Eur J Biochem*, 267, 6413-6422.
- Sodi, S.A., Chakraborty, A.K., Platt, J.T., Kolesnikova, N., Rosemlat, S., Keh-Yen, A., Bologna, J.L., Rachkovsky, M.L., Orlow, S.J. and Pawelek, J.M. (1998) Melanoma x macrophage fusion hybrids acquire increased melanogenesis and metastatic potential: altered N-glycosylation as an underlying mechanism. *Pigment Cell Res*, 11, 299-309.
- Southard-Smith, E.M., Kos, L. and Pavan, W.J. (1998) Sox10 mutation disrupts neural crest development in Dom Hirschsprung mouse model. *Nat Genet*, 18, 60-64.
- Steingrimsson, E., Copeland, N.G. and Jenkins, N.A. (2004) Melanocytes and the Microphthalmia Transcription Factor Network. *Annu Rev Genet*.
- Stoll, R., Renner, C., Zweckstetter, M., Bruggert, M., Ambrosius, D., Palme, S., Engh, R.A., Golob, M., Breibach, I., Buettner, R., Voelter, W., Holak, T.A. and Bosserhoff, A.K. (2001) The extracellular human melanoma inhibitory activity (MIA) protein adopts an SH3 domain-like fold. *Embo J*, 20, 340-349.
- Suyama, K., Shapiro, I., Guttman, M. and Hazan, R.B. (2002) A signaling pathway leading to metastasis is controlled by N-cadherin and the FGF receptor. *Cancer Cell*, 2, 301-314.
- Tachibana, M. (2000) MITF: a stream flowing for pigment cells. *Pigment Cell Res*, 13, 230-240.
- Tachibana, M., Takeda, K., Nobukuni, Y., Urabe, K., Long, J.E., Meyers, K.A., Aaronson, S.A. and Miki, T. (1996) Ectopic expression of MITF, a gene for Waardenburg syndrome type 2, converts fibroblasts to cells with melanocyte characteristics. *Nat Genet*, 14, 50-54.
- Takeda, K., Takemoto, C., Kobayashi, I., Watanabe, A., Nobukuni, Y., Fisher, D.E. and Tachibana, M. (2000) Ser298 of MITF, a mutation site in Waardenburg syndrome type 2, is a phosphorylation site with functional significance. *Hum Mol Genet*, 9, 125-132.

- Takemoto, C.M., Yoon, Y.J. and Fisher, D.E. (2002) The identification and functional characterization of a novel mast cell isoform of the microphthalmia-associated transcription factor. J Biol Chem, 277, 30244-30252.*
- Tassabehji, M., Newton, V.E., Leverton, K., Turnbull, K., Seemanova, E., Kunze, J., Sperling, K., Strachan, T. and Read, A.P. (1994) PAX3 gene structure and mutations: close analogies between Waardenburg syndrome and the Splotch mouse. Hum Mol Genet, 3, 1069-1074.*
- Tassabehji, M., Read, A.P., Newton, V.E., Harris, R., Balling, R., Gruss, P. and Strachan, T. (1992) Waardenburg's syndrome patients have mutations in the human homologue of the Pax-3 paired box gene. Nature, 355, 635-636.*
- Tatzel, J., Poser, I., Schroeder, J. and Bosserhoff, A.K. (2005) Inhibition of melanoma inhibitory activity (MIA) expression in melanoma cells leads to molecular and phenotypic changes. Pigment Cell Res, 18, 92-101.*
- Thiery, J.P. (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. Nat Rev Cancer, 2, 442-454.*
- Thiery, J.P. (2003) Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. Curr Opin Cell Biol, 15, 740-746.*
- Thomson, J.A., Murphy, K., Baker, E., Sutherland, G.R., Parsons, P.G., Sturm, R.A. and Thomson, F. (1995) The brn-2 gene regulates the melanocytic phenotype and tumorigenic potential of human melanoma cells. Oncogene, 11, 691-700.*
- Tucker, M.A. and Goldstein, A.M. (2003) Melanoma etiology: where are we? Oncogene, 22, 3042-3052.*
- Vachtenheim, J., Novotna, H. and Ghanem, G. (2001) Transcriptional repression of the microphthalmia gene in melanoma cells correlates with the unresponsiveness of target genes to ectopic microphthalmia-associated transcription factor. J Invest Dermatol, 117, 1505-1511.*
- Van Belle, P.A., Elenitsas, R., Satyamoorthy, K., Wolfe, J.T., Guerry, D.t., Schuchter, L., Van Belle, T.J., Albelda, S., Tahin, P., Herlyn, M. and Elder, D.E. (1999) Progression-related expression of beta3 integrin in melanomas and nevi. Hum Pathol, 30, 562-567.*
- Van Lint, C., Emiliani, S. and Verdin, E. (1996) The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation. Gene Expr, 5, 245-253.*
- Vance, K.W. and Goding, C.R. (2004) The transcription network regulating melanocyte development and melanoma. Pigment Cell Res, 17, 318-325.*
- Varner, J.A. and Cheresch, D.A. (1996) Integrins and cancer. Curr Opin Cell Biol, 8, 724-730.*
- Virador, V.M., Muller, J., Wu, X., Abdel-Malek, Z.A., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Kobayashi, N., Wakamatsu, K., Ito, S., Hammer, J.A. and Hearing, V.J. (2002) Influence of*

- alpha-melanocyte-stimulating hormone and ultraviolet radiation on the transfer of melanosomes to keratinocytes. Faseb J, 16, 105-107.*
- Wakefield, L.M. and Roberts, A.B. (2002) *TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. Curr Opin Genet Dev, 12, 22-29.*
- Wang, L. and Banerjee, S. (2004) *Differential PIAS3 expression in human malignancy. Oncol Rep, 11, 1319-1324.*
- Watanabe, A., Takeda, K., Ploplis, B. and Tachibana, M. (1998) *Epistatic relationship between Waardenburg syndrome genes MITF and PAX3. Nat Genet, 18, 283-286.*
- Wehrle-Haller, B. and Weston, J.A. (1995) *Soluble and cell-bound forms of steel factor activity play distinct roles in melanocyte precursor dispersal and survival on the lateral neural crest migration pathway. Development, 121, 731-742.*
- Widlund, H.R. and Fisher, D.E. (2003) *Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival. Oncogene, 22, 3035-3041.*
- Wollina, U., Kilian, U., Henkel, U., Schaarschmidt, H. and Knopf, B. (1991) *The initial steps of tumor progression in melanocytic lineage: a histochemical approach. Anticancer Res, 11, 1405-1414.*
- Woods, D., Cherwinski, H., Venetsanakos, E., Bhat, A., Gysin, S., Humbert, M., Bray, P.F., Saylor, V.L. and McMahon, M. (2001) *Induction of beta3-integrin gene expression by sustained activation of the Ras-regulated Raf-MEK-extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. Mol Cell Biol, 21, 3192-3205.*
- Xu, W., Gong, L., Haddad, M.M., Bischof, O., Campisi, J., Yeh, E.T. and Medrano, E.E. (2000) *Regulation of microphthalmia-associated transcription factor MITF protein levels by association with the ubiquitin-conjugating enzyme hUBC9. Exp Cell Res, 255, 135-143.*
- Yamanishi, D.T., Buckmeier, J.A. and Meyskens, F.L., Jr. (1991) *Expression of c-jun, jun-B, and c-fos proto-oncogenes in human primary melanocytes and metastatic melanomas. J Invest Dermatol, 97, 349-353.*
- Yasumoto, K., Yokoyama, K., Shibata, K., Tomita, Y. and Shibahara, S. (1994) *Microphthalmia-associated transcription factor as a regulator for melanocyte-specific transcription of the human tyrosinase gene. Mol Cell Biol, 14, 8058-8070.*
- Yoshida, M., Horinouchi, S. and Beppu, T. (1995) *Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function. Bioessays, 17, 423-430.*
- Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M. and Beppu, T. (1990) *Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. J Biol Chem, 265, 17174-17179.*



## ***Danksagung***

Danken möchte ich vor allem Frau Prof. Dr. Anja-Katrin Boßerhoff für die Möglichkeit, in ihrem Labor meine Dissertation anfertigen zu können. Auch möchte ich mich für ihre Betreuung bedanken, die Gespräche, Anregungen und Hilfestellungen, die mich durch die letzten drei Jahre geleitet haben.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Armin Kurtz. Seine Betreuung von Seiten der Universität ermöglichte mir erst meine Promotion am Klinikum Regensburg. Herrn Prof. Dr. Hofstädter möchte ich danken, dass ich in seinem Institut meine Arbeit anfertigen konnte. Frau Ina Poser danke ich für die Generierung der Daten, die für meine Arbeit als Grundlage dienten (Array und Powerblot).

Jacqueline Schlegel, Ann-Kathrin Wenke, Richard Bauer und Marion Schuierer danke ich für die nette Atmosphäre in dieser Zeit, die das Arbeiten doch sehr angenehm gemacht hat. Danken möchte ich vor allem auch Marion Schuierer für die guten Diskussionen, Hilfestellungen, und Ratschläge und ganz besonders für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ganz besonders aber möchte ich mich bei meiner Familie bedanken – sie hat mich stets in meinem Tun unterstützt und mir alle Möglichkeiten gegeben, mich so zu entwickeln, wie ich heute bin. Auch möchte ich mich bei Matthias Nowak ganz herzlich für seine unendliche Unterstützung während der letzten zweieinhalb Jahre bedanken.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Simone Diermeier und Arabel Vollmann für das kritische Lesen meiner Arbeit und die nette Atmosphäre im Schreibraum.

Der Frauenförderung der Universität Regensburg möchte ich für die finanzielle Unterstützung danken, die mir zusammen mit der GlaxoSmithKline-Stiftung meine Kongressreise in die USA ermöglicht hat. Auch der Stiftung gilt mein Dank.